

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

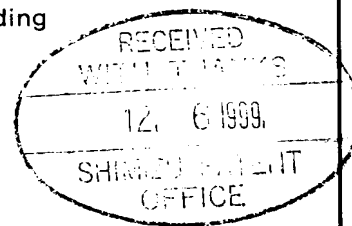
NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building  
6th floor  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON

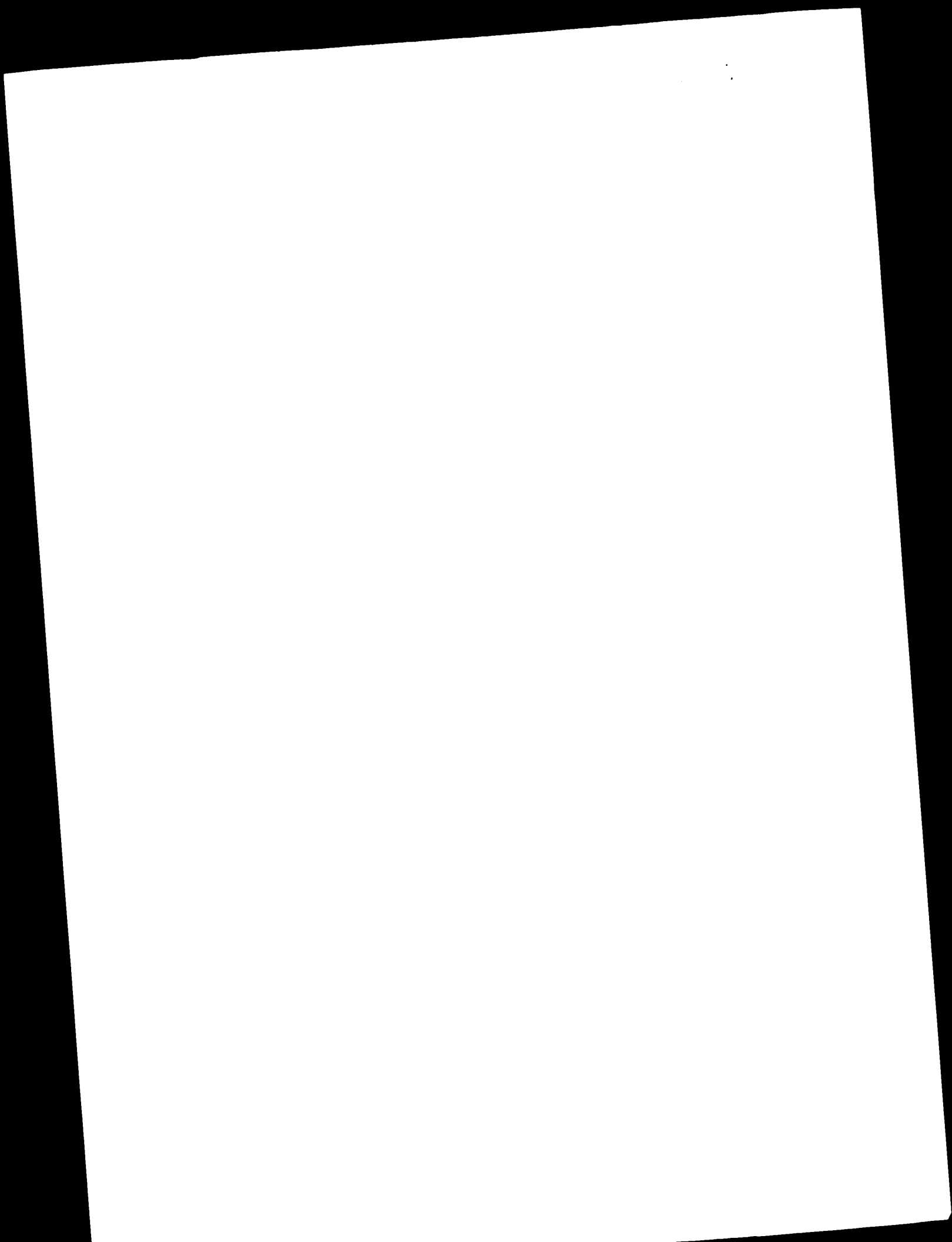


Date of mailing (day/month/year) 25 November 1999 (25.11.99)	
Applicant's or agent's file reference SEN-001PCT	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/JP99/04769	International filing date (day/month/year) 02 September 1999 (02.09.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 02 September 1998 (02.09.98)
Applicant CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An **asterisk(\*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters **"NR"** appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
02 Sept 1998 (02.09.98)	10/248861	JP	22 Nove 1999 (22.11.99)

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer Carlos Naranjo</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------



# PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

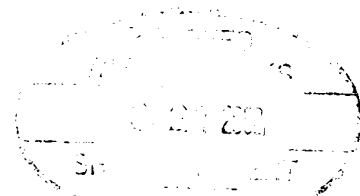
## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building  
6th floor  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 16 March 2000 (16.03.00)		<b>IMPORTANT NOTICE</b>	
Applicant's or agent's file reference SEN-001PCT			
International application No. PCT/JP99/04769	International filing date (day/month/year) 02 September 1999 (02.09.99)	Priority date (day/month/year) 02 September 1998 (02.09.98)	
Applicant CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
**AU,CN,EP,JP,KP,KR,US**

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

**AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW**

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on  
16 March 2000 (16.03.00) under No. WO 00/14108

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer  J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------





## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building  
6th floor  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 20 March 2000 (20.03.00)		
Applicant's or agent's file reference SEN-001PCT		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP99/04769	International filing date (day/month/year) 02 September 1999 (02.09.99)	
Applicant CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, IL, JP, KP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM


OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BY, CH, CR, CU, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MW, MX, PT, SD, SG, SI,  
SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed **until 31 months from the priority date** for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  Christelle Croci  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

The first part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. This is essential for ensuring the integrity of the financial system and for providing a clear audit trail. The second part of the paper focuses on the role of the auditor in verifying the accuracy of the records. The auditor must ensure that all transactions are properly recorded and that the records are consistent with the underlying business transactions. The third part of the paper discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. This is essential for ensuring the integrity of the financial system and for providing a clear audit trail. The fourth part of the paper focuses on the role of the auditor in verifying the accuracy of the records. The auditor must ensure that all transactions are properly recorded and that the records are consistent with the underlying business transactions.

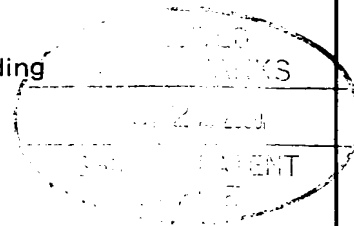
## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building  
6th floor  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 11 April 2000 (11.04.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference SEN-001PCT	
International application No. PCT/JP99/04769	International filing date (day/month/year) 02 September 1999 (02.09.99)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD. Marunouchi Building 5-1, Marunouchi 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-0005 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD. Shin-Marunouchi Building 5-1, Marunouchi 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-0005 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Jean-Marie McAdams
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）



出願人代理人

清 水 初 志

殿

あて名  
〒

300-0847

茨城県土浦市御町1-1-1

関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)  
〔PCT規則71.1〕

発送日  
(日.月.年)

03.10.00

出願人又は代理人  
の書類記号

SEN-001PCT

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP99/04769

国際出願日

(日.月.年) 02.09.99

優先日

(日.月.年) 02.09.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社先端科学技術インキュベーションセンター

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。
4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）



特 許 協 力 条 約

PCT


国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 書類記号 SEN-001PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/04769	国際出願日 (日.月.年) 02.09.99	優先日 (日.月.年) 02.09.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C07K 2/00, C12N 15/10, C12Q 1/02, G01N 33/50 // C12Q 1/68		
出願人(氏名又は名称) 株式会社先端科学技術インキュベーションセンター		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 22.02.00	国際予備審査報告を作成した日 25.09.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員)  齊 藤 真 由 美 	4 B 8 9 3 1
電話番号 03-3581-1101 内線		3448

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)





## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)という翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)という国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3という翻訳文の言語

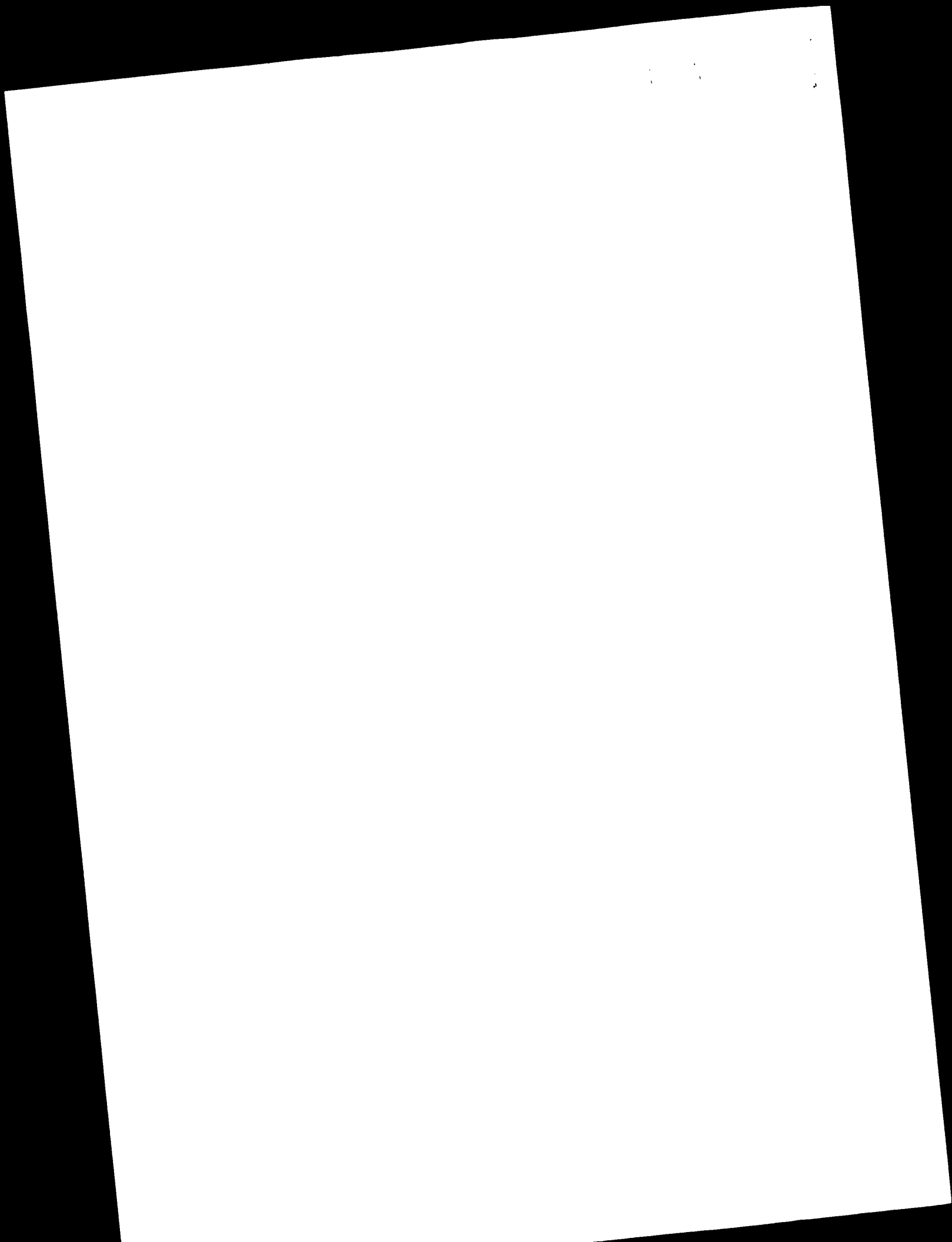
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-12	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-12	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-12	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

特許請求の範囲第1-12項に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献(4文献)に対して新規性、進歩性を有する。国際調査報告で引用された文献(4文献)には、特許請求の範囲第1項に記載のモニター蛋白質、及び、該蛋白質をコードする核酸については記載されておらず、しかもその点は、国際調査報告で引用された文献(4文献)から、当業者といえども容易に想到し得ないものである。

100

100



予備審査請求は各締結国予備審査機関へ直接行わなければならない。  
IPEA/JP

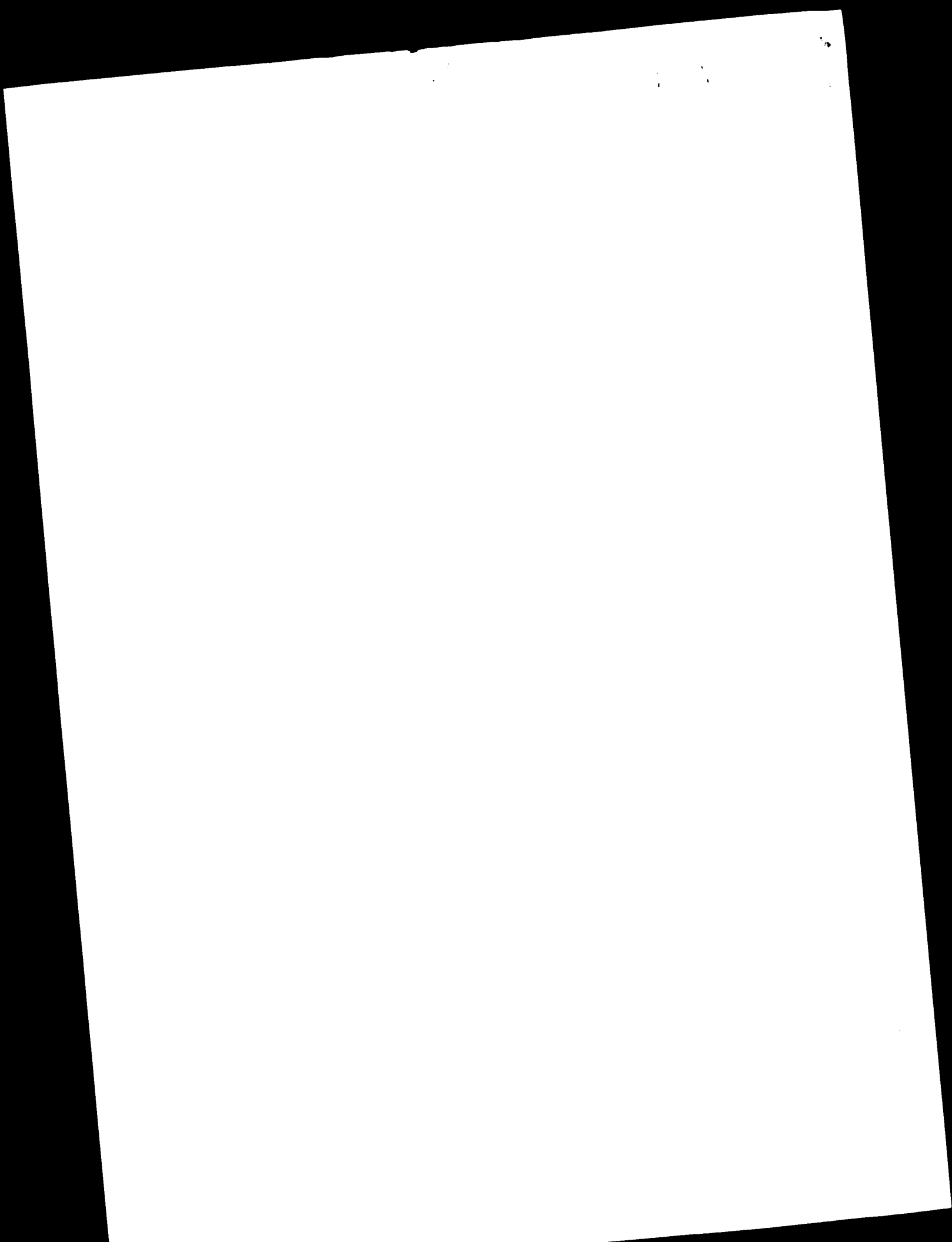
# 特許協力条約に基づく国際出願 国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、  
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。



国際予備審査機関記入欄	
国際予備審査機関の承認	請求書の受理の日
第 I 欄 国際出願の表示	出願人又は代理人の書類記号 SEN-001PCT
国際出願番号 PCT/JP99/04769	国際出願日 (日. 月. 年) 02.09.99
	優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 02.09.98
発明の名称 蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質	
第 II 欄 出願人	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)	
株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD. 〒100-0005 日本国東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 丸ノ内ビルディング Marunouchi Building, 5-1, Marunouchi 1-chome, Chiyoda-ku, TOKYO 100-0005 JAPAN	
電話番号:	
ファクシミリ番号:	
加入電信番号:	
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)	
萩原 正敏 HAGIWARA Masatoshi 〒113-0034 日本国東京都文京区湯島1-5-45 東京医科歯科大学難治疾患研究所内 c/o MEDICAL RESEARCH INSTITUTE, TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, TOKYO 113-0034 JAPAN	
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)	
井上 敏 INOUE Satoshi 〒236-8605 日本国神奈川県横浜市金沢区大川5-1 チッソ株式会社 横浜研究所内 c/o CHISSO CORPORATION, YOKOHAMA RESEARCH CENTER, 5-1, Okawa, Kanazawa-ku, Yokohama-shi, KANAGAWA 236-8605 JAPAN	
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN
<input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人が提案に記載されている。	



第11 欄の記入 出願人

この欄の記入を使用しないときは、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

永井 康雄 NAGAI Yasuo

〒113-0034 日本国東京都文京区湯島1-5-45

東京医科歯科大学難治疾患研究所内

c/o MEDICAL RESEARCH INSTITUTE,

TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY,

1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, TOKYO 113-0034 JAPAN

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

国籍（国名）：

住所（国名）：

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

国籍（国名）：

住所（国名）：

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

国籍（国名）：

住所（国名）：



その他の出願人が他の続葉に記載されている。





## 第III欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

10297 弁理士 清水 初志 SHIMIZU Hatsushi

10877 弁理士 橋本 一憲 HASHIMOTO Kazunori

〒300-0847 日本国茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階

Kantetsu Tsukuba Bldg.6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi,

IBARAKI 300-0847 JAPAN

電話番号：

0298-41-2001

ファクシミリ番号：

0298-41-2009

加入電話番号：

☐ 通知のためのあて名：代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

## 第IV欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述：\*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☐ 明細書に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 請求の範囲に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正（添付した説明書も含む）を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 図面に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲について行った補正を無視し、かつ、取り消されたものとみなして開始することを希望する。

3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20日経過後で延期されることを希望する（ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の受理、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く（規則69.1(d)）。  
（この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。）

\*記入がない場合は、1)補正がないか又は国際予備審査機関が補正（原本又は写し）を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2)国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正（原本又は写し）を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は、日本語であり、

☐ 国際出願の提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

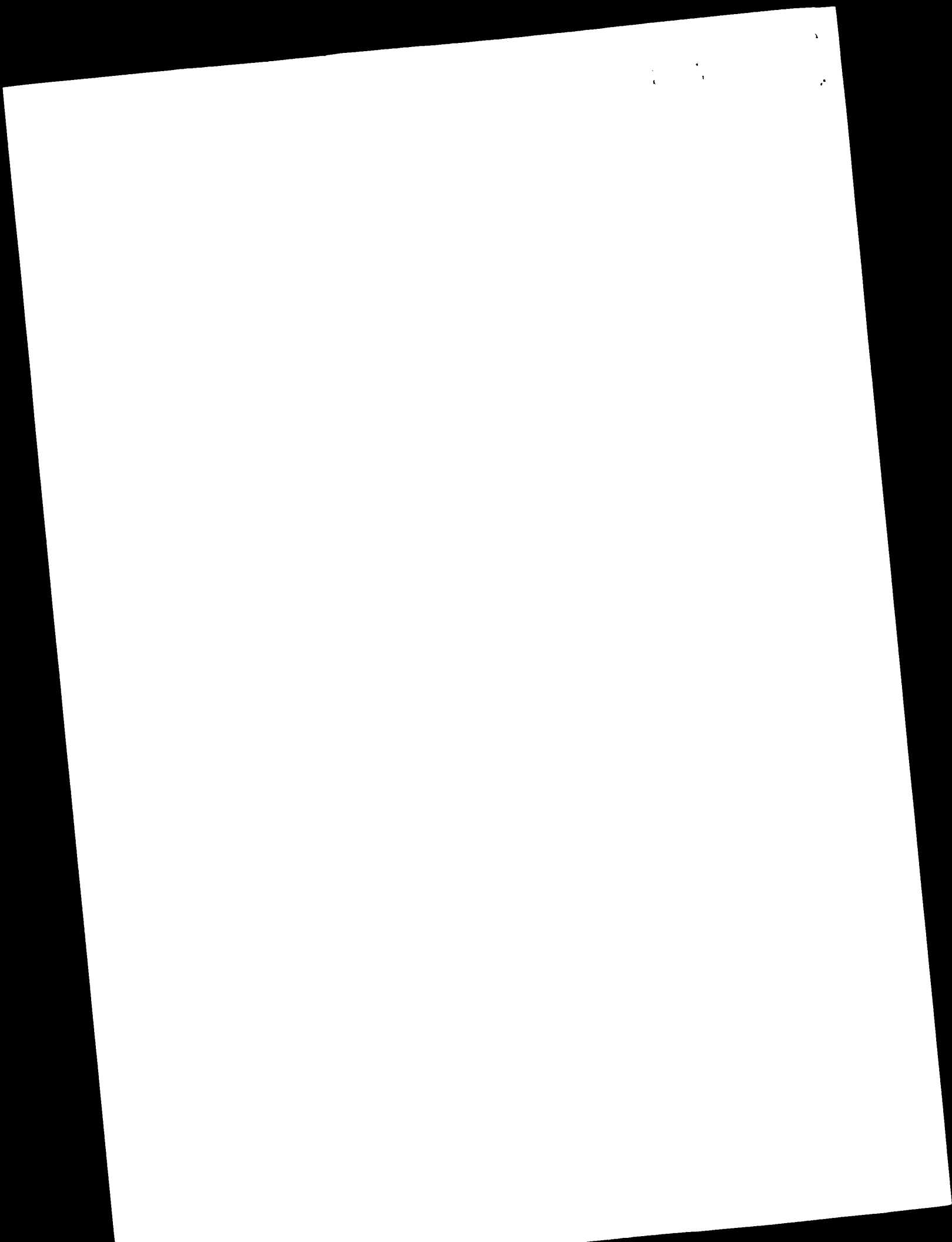
☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

## 第V欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国（即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第II章に拘束されている国）を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。：



## 第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

## 国際予備審査機関記入欄

受 領

未 受 領

1. 国際出願の翻訳文.....

枚

☐☐

2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書.....

枚

☐☐

3. 特許協力条約第19条の規定に基づき補正書.....

枚

☐☐

4. 特許協力条約第19条の規定に基づき説明書.....

枚

☐☐

5. 書簡.....

枚

☐☐

6. その他（書類名を具体的に記載する）:

枚

☐☐

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙3. ☐ 包括委任状の写し☒ 添付する手数料に相当する特許印紙を4. ☐ 記名押印（署名）に関する説明書☒ 国際事務局の口座への振込を証明する書面5. ☐ スクレキシブルディスク酸配列表2. ☐ 別個の記名押印された委任状6. ☐ その他（書類名を具体的に記載する）:

## 第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

弁理士 清水 初志



弁理士 橋本 一憲



1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

## 国際予備審査機関記入欄

2. 規則 80.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。☐ 出願人に通知した。4. ☐ 規則 80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

## 国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:



# 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

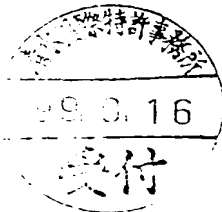
出願人代理人

清水 初志

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所



殿

P C T

## 国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）  
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP99/04769

RO105

発送日（日、月、年）

14.09.99

出願人又は代理人

の書類記号

SEN-001PCT

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/04769

国際出願日（日、月、年）

02.09.99

優先日（日、月、年）

02.09.98

出願人（氏名又は名称）

株式会社先端科学技術インキュベーションセンター

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、14日09月99年に国際事務局に送付した。

### 注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官



# 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

清水 初志

あて名

〒300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所



殿

P C T

## 手続補正命令書

（法第6条、法施第30条）

〔PCT3条（4）（i）14条（1）、規則26〕

PCT/JP99/04769

RO106

		発送日（日、月、年）	14. 09. 99
出願人又は代理人 の書類記号	SEN-001PCT	応答期間	発送日から 1箇月以内
国際出願番号	PCT/JP99/04769	国際出願日（日、月、年）	02. 09. 99
出願人（氏名又は名称） 株式会社先端科学技術インキュベーションセンター			

出願人は、上記期間内に手続きの補正をしなければならない。補正すべき事項は、次の附属書に記載されている。

☒ 附属書A

☐ 附属書B

☐ 附属書C

（注意）

### 補正の方法

手続補正書に補正事項を補正した差替え用紙を添付することにより行う。また、手続補正書の「補正内容」の欄に差替えられる用紙と差替え用紙との相違について記載する。なお、補正によって書き換えられる用紙の明瞭さ及び直接複製の可能性に悪影響を及ぼすことなく手続補正書の「補正内容」の欄から記録原本への書き換えが容易にできる場合には差替え用紙を省略することができる。

（PCT規則26. 4（a）、法施行規則様式第15備考4参照）

### 注意

補正がされないときは、国際出願は取り下げられたものとみなす旨の決定がされる。

（法第7条第1項、PCT規則26. 5参照）

この手続補正命令書の写し及び附属書の写しは、国際事務局

☐ 及び国際調査機関

に、送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/106（1998年7月）

権限のある職員

特許庁長官





## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C. 20231  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 20 March 2000 (20.03.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/04769	<b>Applicant's or agent's file reference</b> SEN-001PCT
<b>International filing date</b> (day/month/year) 02 September 1999 (02.09.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 02 September 1998 (02.09.98)
<b>Applicant</b> HAGIWARA, Masatoshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

22 February 2000 (22.02.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer:

Christelle Croci

Facsimile No. (41) 22 338 83 35

Telephone No. (41) 22 338 83 35



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

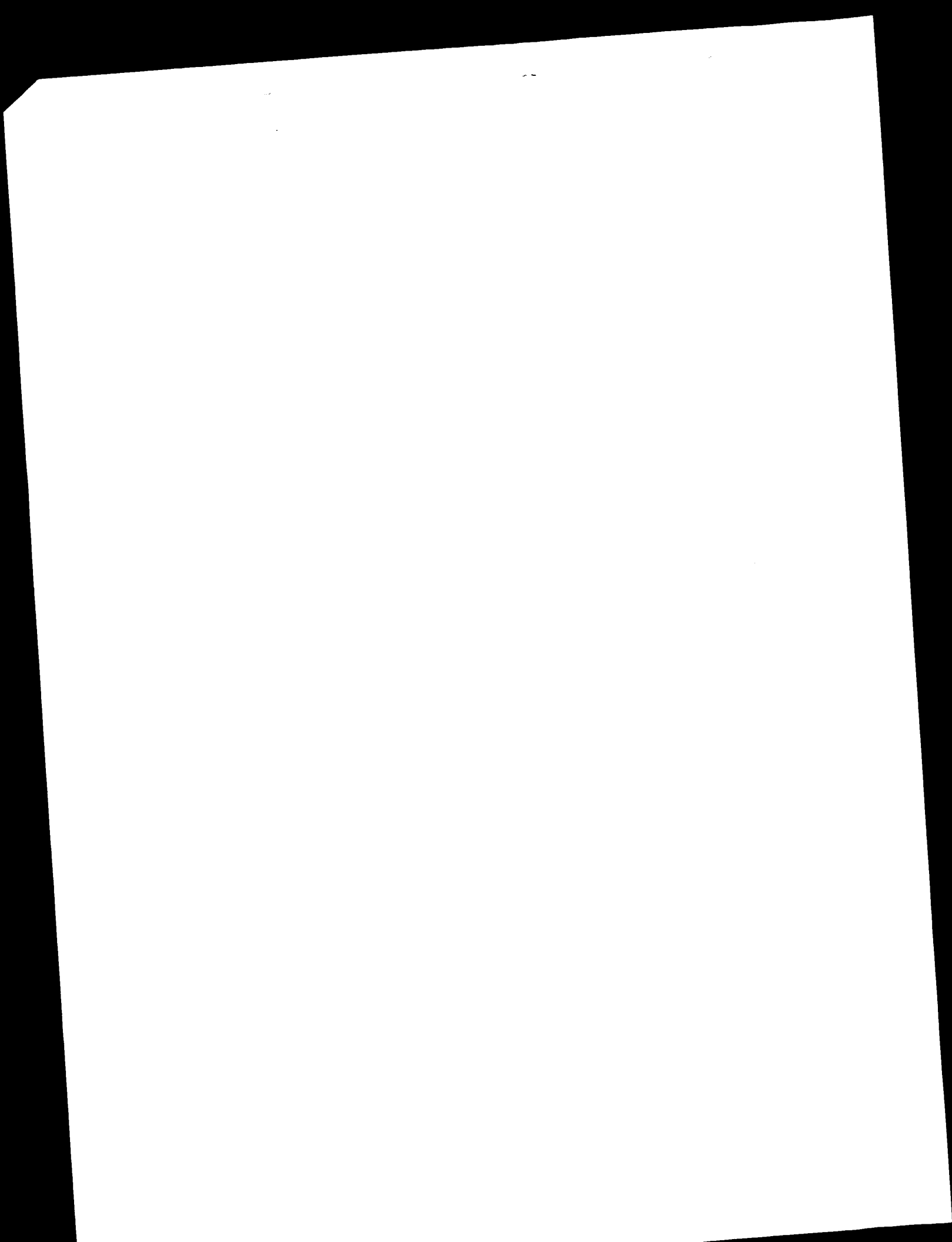
To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building  
6th floor  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 11 April 2000 (11.04.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference SEN-001PCT	
International application No. PCT/JP99/04769	International filing date (day/month/year) 02 September 1999 (02.09.99)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD. Marunouchi Building 5-1, Marunouchi 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-0005 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD. Shin-Marunouchi Building 5-1, Marunouchi 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-0005 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  Jean-Marie McAdams
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

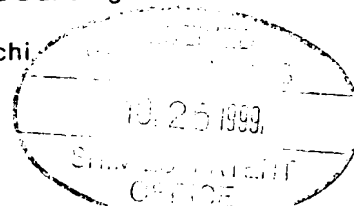
NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building  
6th floor  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON



<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 23 September 1999 (23.09.99)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
<b>Applicant's or agent's file reference</b> SEN-001PCT	<b>International application No.</b> PCT/JP99/04769

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD. (for all designated States except US)

HAGIWARA, Masatoshi et al (for US)

International filing date : 02 September 1999 (02.09.99)

Priority date(s) claimed : 02 September 1998 (02.09.98)

Date of receipt of the record copy by the International Bureau : 17 September 1999 (17.09.99)

List of designated Offices :

AP : GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,UG,ZW

EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE

OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG

National : AE,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EÉ,ES,FI,GB, GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN, MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

## ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☐ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.


<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>Y. KUWAHARA </p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------



特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	
国際出願日	
(受印)	
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)	

SEN-001PCT

第 I 欄 発明の名称

蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載: 法人は公式の完全な名称を記載: あて名は郵便番号及び国名も記載)

株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター  
CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY  
INCUBATION, LTD.  
〒100-0005 日本国東京都千代田区丸の内一丁目5番1号  
丸ノ内ビルヂング  
Marunouchi Building, 5-1, Marunouchi 1-chome, Chiyoda-ku,  
TOKYO 100-0005 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載: 法人は公式の完全な名称を記載: あて名は郵便番号及び国名も記載)

萩原 正敏 HAGIWARA Masatoshi  
〒113-0034 日本国東京都文京区湯島1-5-45  
東京医科歯科大学難治疾患研究所内  
c/o MEDICAL RESEARCH INSTITUTE,  
TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY,  
1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, TOKYO 113-0034 JAPAN

この欄に記載した者は  
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続報に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載: 法人は公式の完全な名称を記載: あて名は郵便番号及び国名も記載)

電話番号:

10297 弁理士 清水 初志 SHIMIZU Hatsushi  
10877 弁理士 橋本 一憲 HASHIMOTO Kazunori  
〒300-0847 日本国茨城県土浦市卸町1-1-1  
関鉄つくばビル6階  
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F,  
1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi, IBARAKI 300-0847 JAPAN

0298-41-2001

ファクシミリ番号:

0298-41-2009

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記欄内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す





## 第 III 欄の続き その他の出願人又は発明者

この欄を使用しないときは、この用紙を綴書に含めないこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

井上 敏 INOUE Satoshi  
〒236-8605 日本国神奈川県横浜市金沢区大川 5-1  
チッソ（株）横浜研究所内  
c/o CHISSO CORPORATION, YOKOHAMA RESEARCH CENTER,  
5-1, Okawa, Kanazawa-ku, Yokohama-shi,  
KANAGAWA 236-8605 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

永井 康雄 NAGAI Yasuo  
〒113-0034 日本国東京都文京区湯島 1-5-45  
東京医科歯科大学難治疾患研究所内  
c/o MEDICAL RESEARCH INSTITUTE,  
TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY,  
1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, TOKYO 113-0034 JAPAN

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の欄に記載されている。



## 第Ⅴ欄 国の指定

規則 4.9 (a) の規定に基づき次の指定を行う (該当する□に「印」を付すこと。少なくとも1つの□に「印」を付すこと)。

## 大規模半島国

- ☒ **AP** **ARIPO** 半島国 : **GH** ガーナ Ghana, **GM** ガンビア Gambia, **KE** ケニア Kenya, **LS** レソト Lesotho, **MW** マラウイ Malawi, **SD** スーダン Sudan, **SL** シェラ・レオネ Sierra Leone, **SZ** スワジランド Swaziland, **UG** ウガンダ Uganda, **ZW** ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **EA** **ユーラシア** 半島国 : **AM** アルメニア Armenia, **AZ** アゼルバイジャン Azerbaijan, **BY** ベラルーシ Belarus, **KG** キルギス Kyrgyzstan, **KZ** カザフスタン Kazakhstan, **MD** モルドヴァ Republic of Moldova, **RU** ロシア Russian Federation, **TJ** タジキスタン Tajikistan, **TM** トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **EP** **ヨーロッパ** 半島国 : **AT** オーストリア Austria, **BE** ベルギー Belgium, **CH** and **LI** スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, **CY** キプロス Cyprus, **DE** ドイツ Germany, **DK** デンマーク Denmark, **ES** スペイン Spain, **FI** フィンランド Finland, **FR** フランス France, **GB** 英国 United Kingdom, **GR** ギリシャ Greece, **IE** アイルランド Ireland, **IT** イタリア Italy, **LU** ルクセンブルグ Luxembourg, **MC** モナコ Monaco, **NL** オランダ Netherlands, **PT** ポルトガル Portugal, **SE** スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **OA** **OAPI** 半島国 : **BF** ブルキナ・ファソ Burkina Faso, **BJ** ベナン Benin, **CF** 中央アフリカ Central African Republic, **CG** コンゴ Congo, **CI** コートジボアール Côte d'Ivoire, **CM** カメルーン Cameroon, **GA** ガボン Gabon, **GN** ギニア Guinea, **GW** ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, **ML** マリ Mali, **MR** モーリタニア Mauritania, **NI** ニジェール Niger, **SN** セネガル Senegal, **TD** チャード Chad, **TG** トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国 (他の種族の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

## [国] 半島国 (他の種族の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- |                                                                                                          |                                                                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> アラブ首長国連邦 United Arab Emirates                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> リベリア Liberia                                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> アルバニア Albania                                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> レソト Lesotho                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> アルメニア Armenia                                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> リトアニア Lithuania                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> オーストリア Austria                                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> ルクセンブルグ Luxembourg                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> オーストラリア Australia                                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> ラトヴィア Latvia                                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> アゼルバイジャン Azerbaijan                                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> モルドヴァ Republic of Moldova                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> マダガスカル Madagascar                                           |
|                                                                                                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> バルバドス Barbados                                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> モンゴル Mongolia                                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> ブルガリア Bulgaria                                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> マラウイ Malawi                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> ブラジル Brazil                                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> メキシコ Mexico                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> ベラルーシ Belarus                                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> ノルウェー Norway                                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> カナダ Canada                                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> ニュー・ジーランド New Zealand                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH</b> and <b>LI</b> スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> ポーランド Poland                                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> 中国 China                                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> ポルトガル Portugal                                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> キューバ Cuba                                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> ルーマニア Romania                                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> チェッコ Czech Republic                                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> ロシア Russian Federation                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> ドイツ Germany                                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> スーダン Sudan                                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> デンマーク Denmark                                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> スウェーデン Sweden                                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> エストニア Estonia                                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> シンガポール Singapore                                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> スペイン Spain                                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> スロヴェニア Slovenia                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> フィンランド Finland                                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> スロヴァキア Slovakia                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> 英国 United Kingdom                                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> シェラ・レオネ Sierra Leone                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> グレナダ Grenada                                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> タジキスタン Tajikistan                                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> グルジア Georgia                                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> トルクメニスタン Turkmenistan                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> ガーナ Ghana                                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> トルコ Turkey                                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> ガンビア Gambia                                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> クロアチア Croatia                                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> ウクライナ Ukraine                                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> ハンガリー Hungary                                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> ウガンダ Uganda                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> インドネシア Indonesia                                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> 米国 United States of America                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> イスラエル Israel                                               |                                                                                                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> インド India                                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> ウズベキスタン Uzbekistan                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> アイスランド Iceland                                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> ヴイエトナム Viet Nam                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> 日本 Japan                                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> ユーゴスラヴィア Yugoslavia                                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> ケニア Kenya                                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> 南アフリカ共和国 South Africa                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> キルギス Kyrgyzstan                                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> ジンバブエ Zimbabwe                                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KP</b> 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea                  |                                                                                                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> 韓国 Republic of Korea                                       |                                                                                                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> カザフスタン Kazakhstan                                          |                                                                                                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> セント・ルシア Saint Lucia                                        |                                                                                                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> スリ・ランカ Sri Lanka                                           |                                                                                                           |

下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定するためのものである

- ☒ **CR** コスタリカ Costa Rica
- ☒ **DM** ドミニカ Dominica
- ☐

指定の確認の官署は、上記の指定に加えて、規則 4.9 (b) の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この官署から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除外される。出願人は、これらの追記される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り上げられたものとみなされることを宣言する。(指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官署へ提出しなければならない。)



## 第VI欄 優先権の主張

☐ 他優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている

先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 02.09.98	平成10年特許願 第248861号	日本国 JAPAN		
(2)				
(3)				

☐ 上記( )の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の( )の番号のものについては、出願書類の認証原本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

\*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

## 第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択

先の調査結果の利用請求：当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日（日、月、年）

出願番号

国名（又は広域官庁）

ISA / JP

## 第VIII欄 照会欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 ..... 4 枚  
 明細書（配列表を除く）..... 23 枚  
 請求の範囲 ..... 2 枚  
 要約書 ..... 1 枚  
 図面 ..... 9 枚  
 明細書の配列表 ..... 5 枚  
 合計 ..... 44 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙  
☒ 納付した手数料に相当する特許印紙を貼付した書面  
☐ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面  
2. ☐ 別紙の記名押印された委任状  
3. ☒ 包括委任状の写し  
4. ☐ 記名押印（署名）の説明書  
5. ☐ 優先権書類（上記第VI欄の( )の番号を記載する）  
6. ☐ 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）  
7. ☐ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面  
8. ☒ スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク）  
9. ☒ その他（名前を詳細に記載する）  
 フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面、陳述書

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名： 日本語

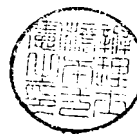
## IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

弁理士 清水 初志



弁理士 橋本 一憲

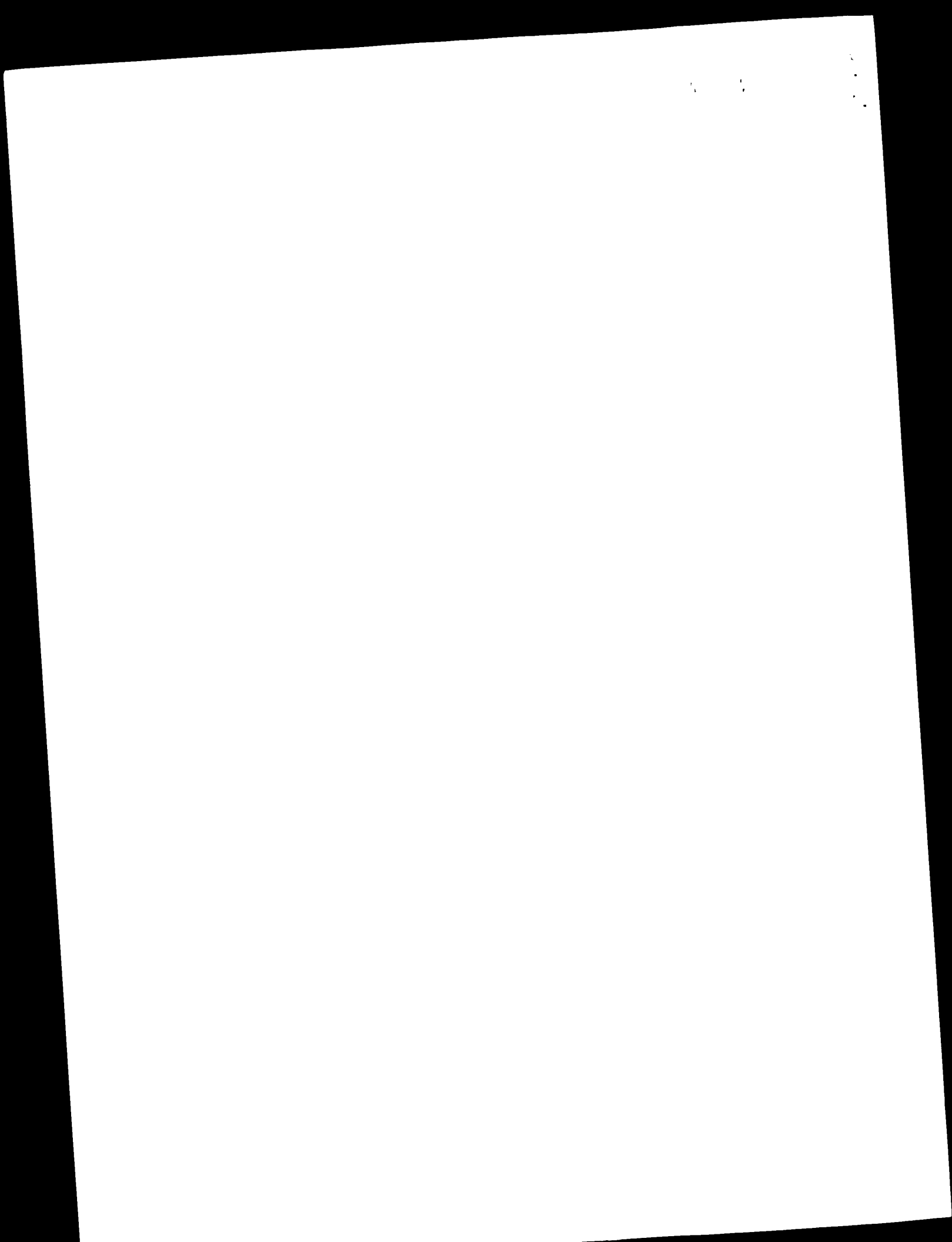


## 受理官庁書記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日	2. 図面 <input type="checkbox"/> 受理された <input type="checkbox"/> 不足図面がある
3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日	
5. 出願人により特定された 国際調査機関 ISA / JP	
6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない	

## 国際事務局書記入欄

記録原本の受理の日



137  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

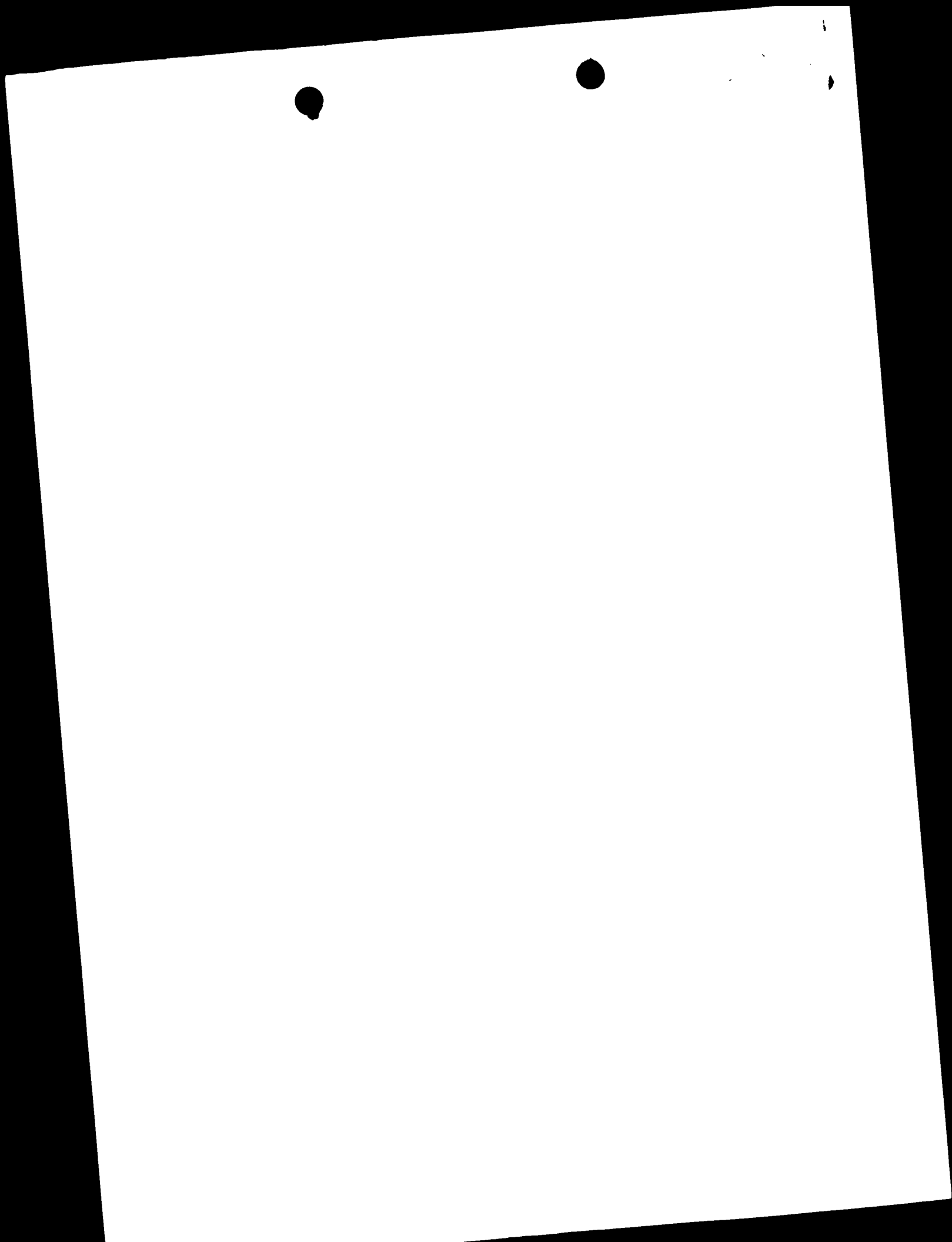
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference SEN-001PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT IPEA 416)	
International application No. PCT/JP99/04769	International filing date ( <i>day month year</i> ) 02 September 1999 (02.09.99)	Priority date ( <i>day month year</i> ) 02 September 1998 (02.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 2/00, C12N 15/10, C12Q 1/02, G01N 33/50 // C12Q 1/68		
Applicant CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 22 February 2000 (22.02.00)	Date of completion of this report 25 September 2000 (25.09.2000)
Name and mailing address of the IPEA IP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.





## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04769

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

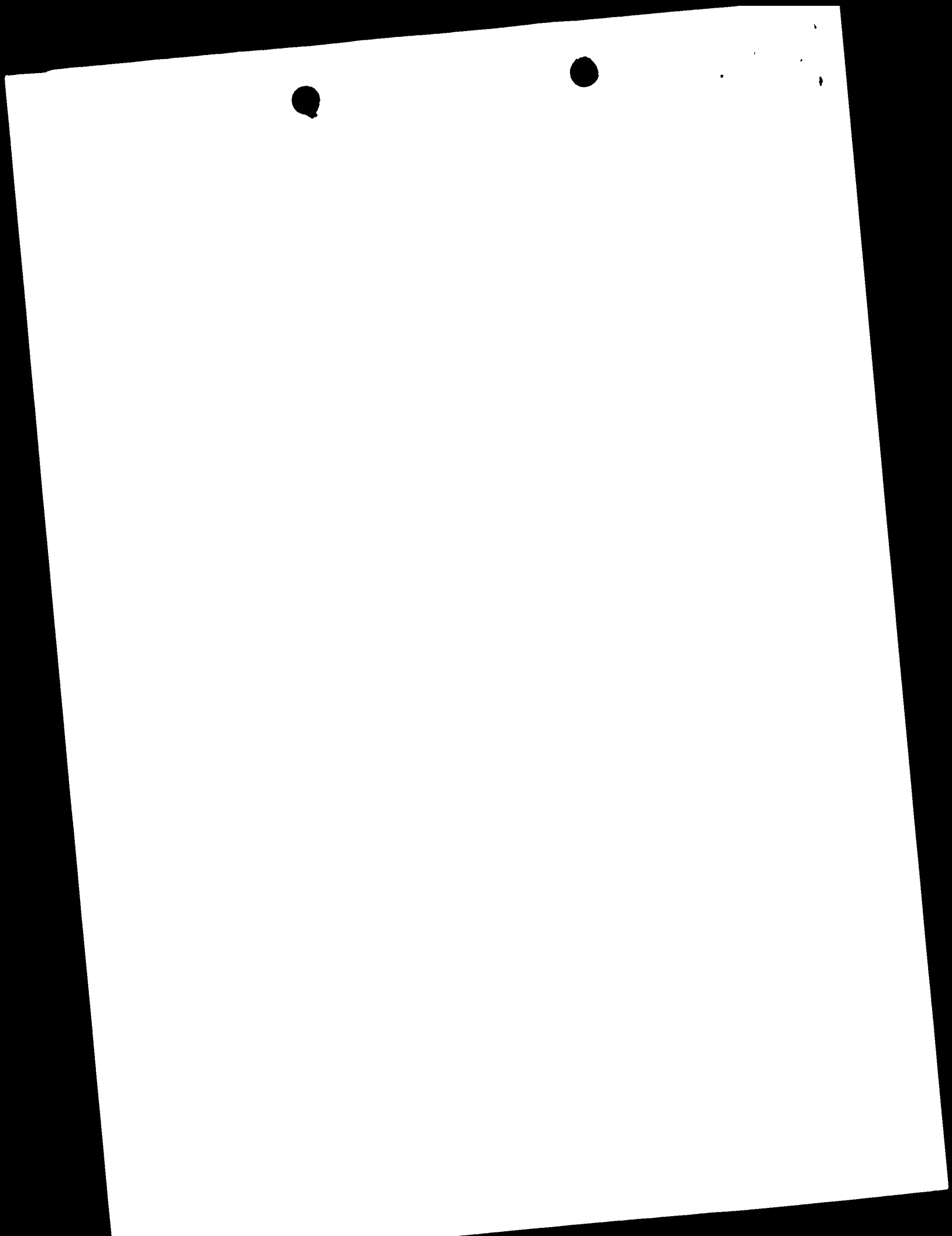
4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04769

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

With regard to claim 1, the point whereby the whole of the electrode magazine containing the electrode guide into which the pipe electrode has been inserted is replaced is not disclosed in any of documents 1-3 cited in the ISR.



EP US

PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
 (PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 SEN-001PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/04769	国際出願日 (日.月.年) 02.09.99	優先日 (日.月.年) 02.09.98
出願人(氏名又は名称) 株式会社先端科学技術インキュベーションセンター		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
 この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

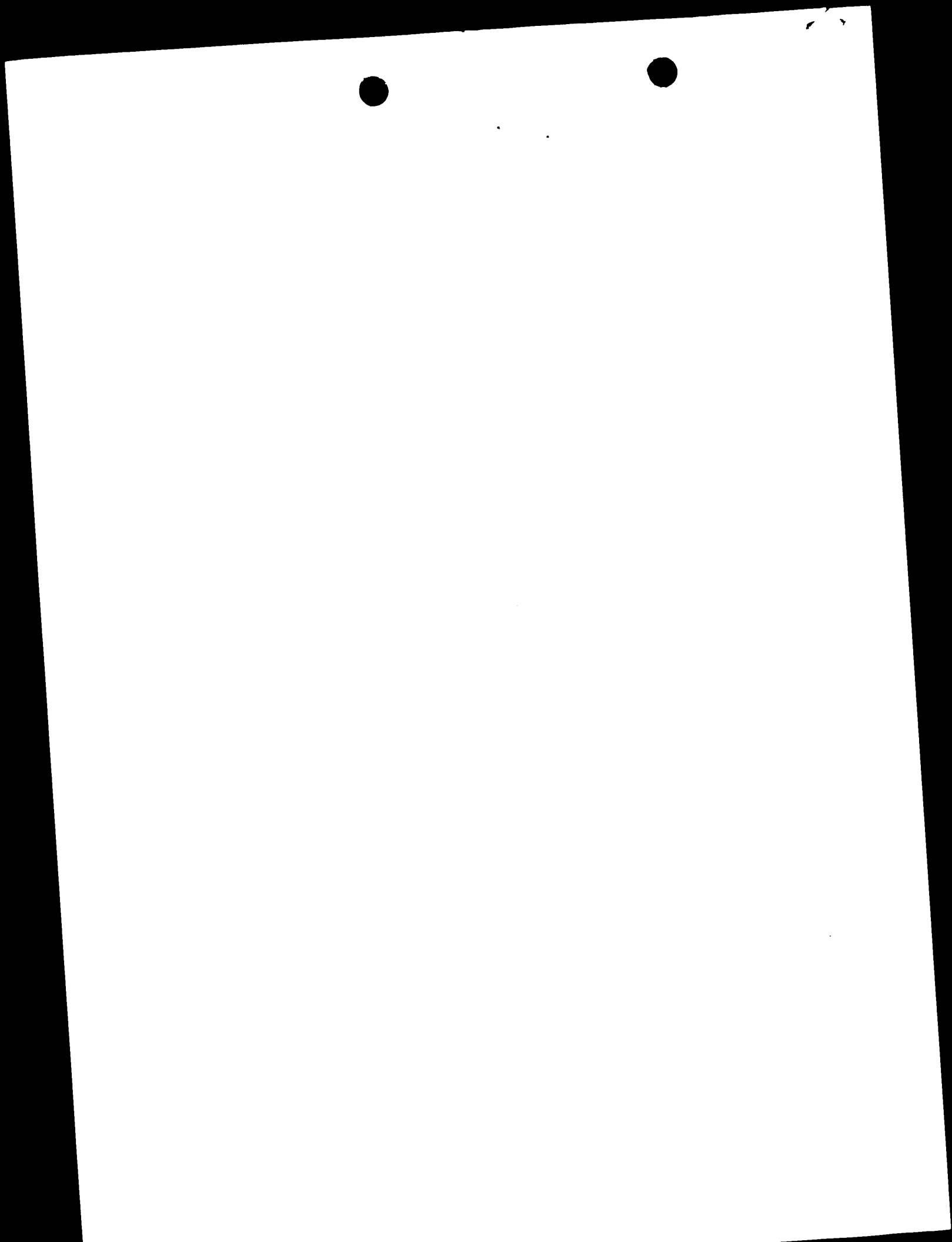
6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>4</sup>

C 07 K 2 / 00, C 12 N 15 / 10, C 12 Q 1 / 02, G 01 N 33 / 50 // C 12 Q 1 / 68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>4</sup>

C 07 K 2 / 00, C 12 N 15 / 10, C 12 Q 1 / 02, G 01 N 33 / 50, C 12 Q 1 / 68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Swiss Prot / PIR / Gene Seq, Genbank / EMBL / DDBJ / Gene Seq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 272, NO. 20, (1997) Valerie A. Romoser et al. "Detection in Living Cells of Ca <sup>2+</sup> -dependent Changes in the Fluorescence Emission of an Indicator Composed of Two Green Fluorescent Protein Variants Linked by a Calmodulin-binding Sequence", see P. 13270-13274	1 - 12
A	NATURE VOL. 388, (1997), Miyawaki et al. "Fluorescent indicators for Ca <sup>2+</sup> based on green fluorescent protein and calmodulin" see P. 882-887	1 - 12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 11. 99

国際調査報告の発送日

14.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

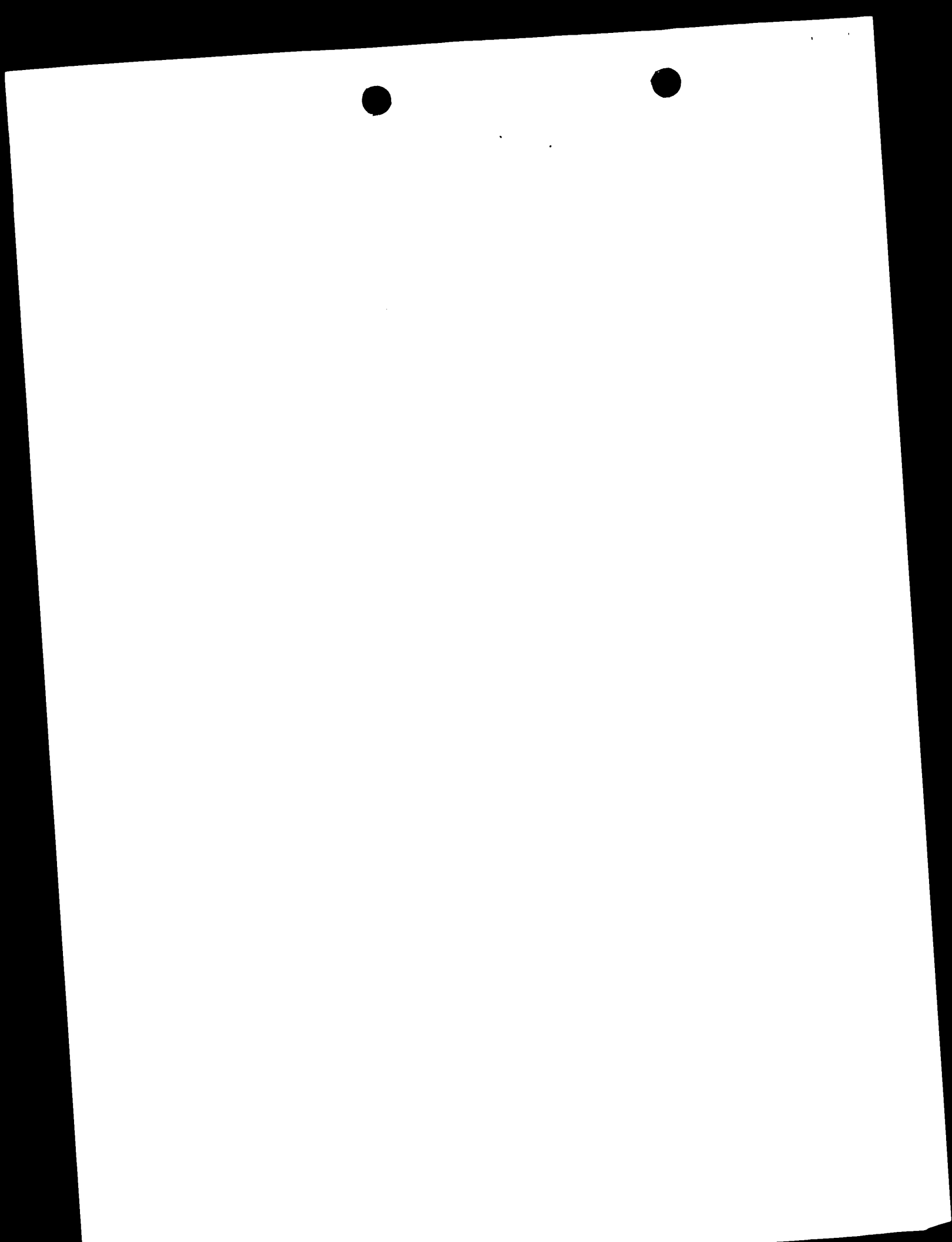
特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

4 B

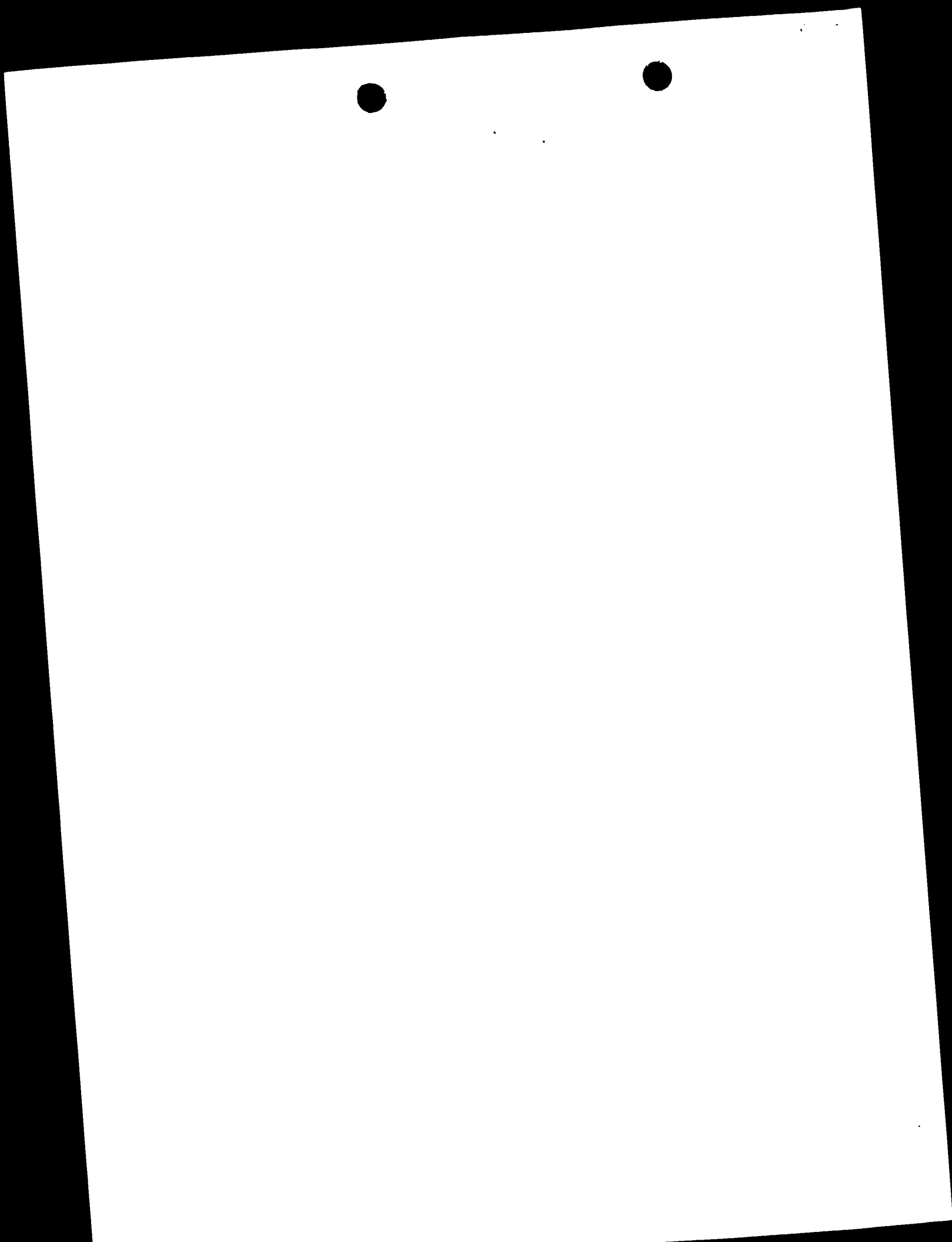
8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448





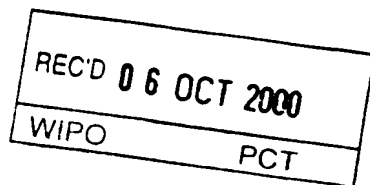
C (続き) . 関連すると認められる文献 .		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY Vol.13, NO.8, (1993), MASATOSI HAGIWARA et al. "Coupling of Hormonal Stimulation and Transcription via the Cyclic AMP-Responsive Factor CREB Is Rate Limited by Nuclear Entry of Protein Kinase A" see P. 4852-4859	1 - 1 2
A	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 271, No. 30, (1996), Atsushi Shimomura et al. "Calmodulin-dependent Protein Kinase II Potentiates Transcriptional Activation through Activating Transcription Factor 1 but Not cAMP Response Element-binding Protein" , see P. 17957-17960	1 - 1 2



PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕



出願人又は代理人 の書類記号 SEN-001PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。		
国際出願番号 PCT/J P 99/04769	国際出願日 (日.月.年) 02.09.99	優先日 (日.月.年) 02.09.98	
国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C07K 2/00, C12N 15/10, C12Q 1/02, G01N 33/50 // C12Q 1/68			
出願人(氏名又は名称) 株式会社先端科学技術インキュベーションセンター			

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u>                    </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 22.02.00	国際予備審査報告を作成した日 25.09.00		
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員)  齊藤真由美	4B	8931
電話番号 03-3581-1101 内線		3448	



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |         |        |                       |
|-------------------------------------|---------|--------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの           |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの           |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの           |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの           |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

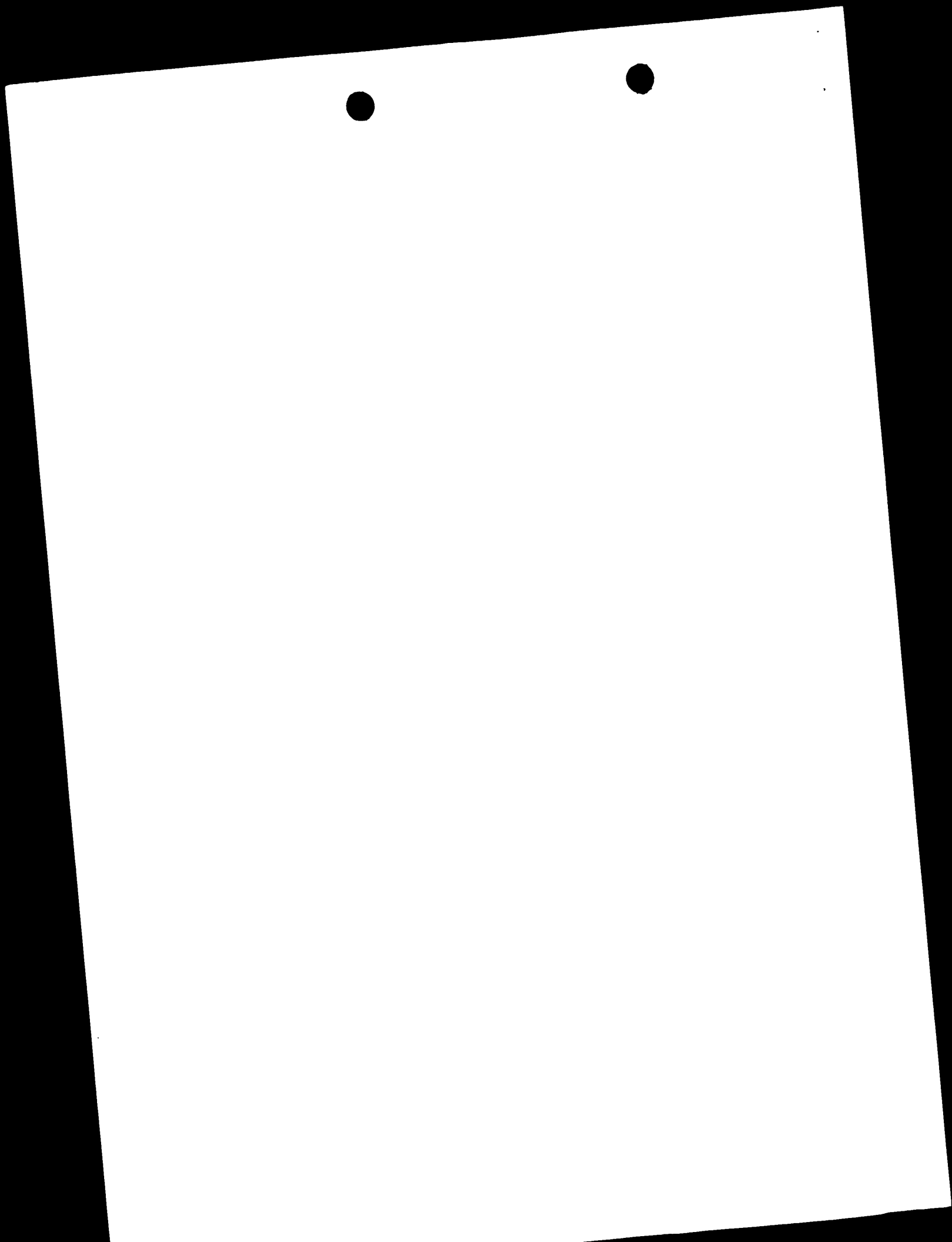
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



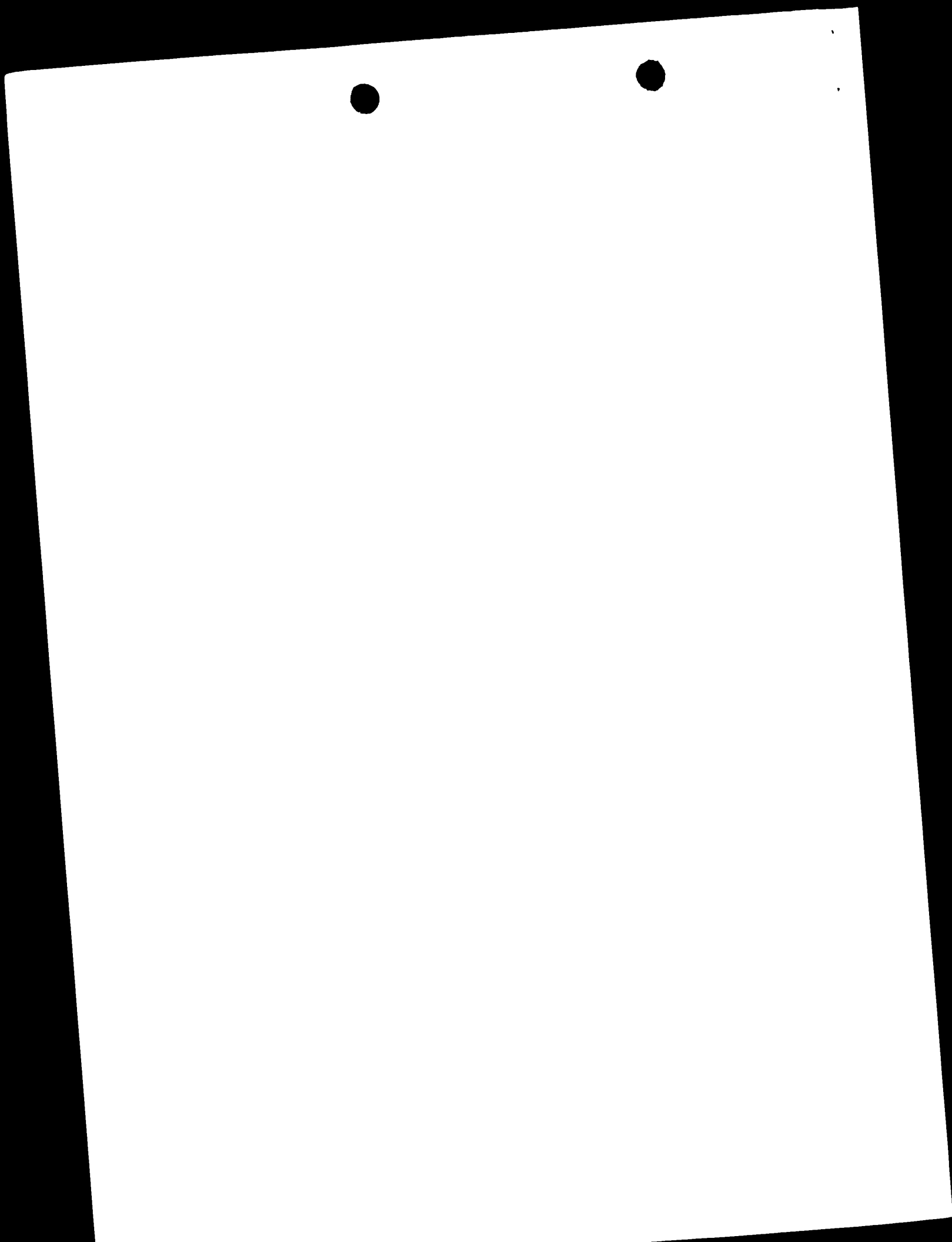
V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1 - 12	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1 - 12	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 12	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

特許請求の範囲第1 - 12項に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献(4文献)に対して新規性、進歩性を有する。国際調査報告で引用された文献(4文献)には、特許請求の範囲第1項に記載のモニター蛋白質、及び、該蛋白質をコードする核酸については記載されておらず、しかもその点は、国際調査報告で引用された文献(4文献)から、当業者といえども容易に想到し得ないものである。





PCT

世界知的所有権  
国際事務局

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 <b>C07K 2/00, C12N 15/10, C12Q 1/02,          G01N 33/50 // C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO00/14108</b>  (43) 国際公開日 2000年3月16日 (16.03.00)
(21) 国際出願番号 PCT JP99-04769  (22) 国際出願日 1999年9月2日 (02.09.99)  (30) 優先権データ 特願平16 248861 ✓ 1998年9月2日 (02.09.98) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター (CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.) [JP, JP] 〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 丸の内ビルディング Tokyo, (JP)  (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 萩原正敏 (HAGIWARA, Masatoshi) [JP, JP] 永井康雄 (NAGAI, Yasuo) [JP, JP] 〒113-0034 東京都文京区湯島1-5-45 東京医科歯科大学 難治疾患研究所内 Tokyo, (JP) 井上 敏 (INOUE, Satoshi) [JP, JP] 〒236-8605 神奈川県横浜市金沢区大川5-1 チッソ株式会社 横浜研究所内 Kanagawa, (JP)		(74) 代理人 弁理士 清水初志、外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄ビルビル6階 Ibaraki, (JP)  (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ニー ラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: <b>MONITOR PROTEIN FOR MEASURING PHOSPHORYLATION OF PROTEIN</b>  (54) 発明の名称 <b>蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質</b>  (57) Abstract A phosphorylation monitor protein by which the phosphorylation in a phosphorylation region can be conveniently monitored has been successfully constructed by using a protein containing the phosphorylation region and a characteristic-variable region wherein characteristics vary due to a change in the three-dimensional structure. As a result, there has been developed a system for analyzing protein phosphorylation which is free from any radioisotope and applicable also to the measurement <i>in vivo</i> . This analytical system is usable not only in detecting a phosphorylation reaction but also in screening a kinase or a compound promoting or inhibiting phosphorylation.		

(57)要約

リン酸化領域と、立体構造の変化によって特性が変化する特性可変領域を含む蛋白質を用いて、該リン酸化領域のリン酸化を簡便にモニターすることができるリン酸化モニター蛋白質を作製することに成功した。本発明によって、放射性同位体を使用せず、かつ、インビボの測定にも適用可能な蛋白質リン酸化の解析系が開発された。本発明の解析系は、単にリン酸化反応の検出のみならず、リン酸化酵素のスクリーニングや、リン酸化を促進または抑制する化合物のスクリーニングにも利用することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパブリック第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦  
AL アルバニア  
AM アルメニア  
AT オーストリア  
AU オーストラリア  
AZ アゼルバイジャン  
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ  
BB バルバドス  
BE ベルギー  
BF ベルギー・フアン  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
BY ベラルーシ  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コートジボアール  
CM カメルーン  
CN 中国  
CR コスタ・リカ  
CU キューバ  
CY キプロス  
CZ チェコ  
DE ドイツ  
DK デンマーク

DM ドミニカ  
EE エストニア  
ES スペイン  
FI フィンランド  
FR フランス  
GA ガボン  
GB 英国  
GD グレナダ  
GE ジョージア  
GH ガーナ  
GN ギニア  
GW ギニア・ビサウ  
GR ギリシャ  
HR クロアチア  
HU ハンガリー  
ID インドネシア  
IE アイルランド  
IL イスラエル  
IN インド  
IS アイスランド  
IT イタリア  
JP 日本  
KE ケニア  
KG キルギスタン  
KP 北朝鮮  
KR 韓国

KZ カザフスタン  
LC センティネル  
LK スリランカ  
LR リベリア  
LS レソト  
LT リトアニア  
LU ルクセンブルグ  
LV ラトヴィア  
MA モロッコ  
MC モナコ  
MD モルドヴァ  
MG マダガスカル  
MK マケドニア  
ML マリ  
MN モンゴル  
MR モリタニア  
MW マラウイ  
MX メキシコ  
NE ニジェール  
NL オランダ  
NO ノールウェー  
NZ ニュージーランド  
PL ポーランド  
PT ポルトガル  
RO ルーマニア

RU ロシア  
SD スーダン  
SG シンガポール  
SI スロベニア  
SK スロバキア  
SL セネガル  
SN セネガル  
SZ ス威士ランド  
TD チャド  
TG トーゴ  
TJ タジキスタン  
TZ タンザニア  
TM トルクメニスタン  
TR トルコ  
TT トリニダード・トバゴ  
UA ウクライナ  
UG ウガンダ  
US 米国  
UZ ウズベキスタン  
VN ベトナム  
YU ユーゴスラビア  
ZA 南アフリカ共和国  
ZW ジンバブエ

## 明細書

### 蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質

#### 技術分野

本発明は、蛋白質をリン酸化する活性を測定するための蛋白質及びこれをコードする核酸に関する。

#### 背景技術

生物の生体内には巧みなスイッチ機構が存在し、このスイッチ機構により分化発生、防御反応、代謝活動等が制御されている。このスイッチ機構の一つとして蛋白質のリン酸化という現象が知られている (Hunter T., 1991, *Methods Enzymol.* 200: 3-37)。このリン酸化は酵素の介在により行なわれているものである。すなわちこの酵素は基質蛋白質にリン酸基を導入して、この基質蛋白質を活性化する。ここで活性化された基質蛋白質は、遺伝子の発現調節や細胞の増殖等、種々の反応を誘導する。

近年、細胞のシグナル伝達と呼ばれる細胞の発生分化等を含めた種々の生体内の反応の基礎となるカスケード機構が明らかにされつつある。この細胞のシグナル伝達経路において、上記リン酸化反応が該経路のオンオフを決定するスイッチ機構の一つとして重要な機能を果たすことが示されている (Hunter T., 1995, *Cell* 80: 225-236)。

現在までの研究において、シグナル伝達経路には複数の経路が存在することが示されている。例えば、ホルモンなどのように直接細胞膜を通過して細胞外の情報を細胞内に伝達する比較的単純な経路もこのシグナル伝達経路の一つである。近年では、複数の分子が相互に連絡して一定の情報を細胞内に伝える複雑な経路も見られている。

その一例として、G蛋白質を介したシグナル伝達の経路がある (Gilman, A.G., 1987, *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649)。この経路においては、細胞膜上に形成されている受容体に特定の物質が結合することが伝達経路を始動させる信号となる。一方、細胞内で受容体と共役しているG蛋白質が、セカンドメッセンジャーであるcAMP (サイクリックアデノシンモノホスフェート; cyclic-adenosine mono phosphate) の細胞内濃度を上昇させる。このcAMP濃度の上昇を利用してある特定のリン酸化酵素がAキナーゼをリン酸化する。このようにして生じたAキナーゼのリン酸化すなわち活性化が核などに信号として伝達されて、カスケード反応の最終ステージにおける生体反応に必要な蛋白などの発現が誘導されるものと考えられている。このG蛋白質を介したシグナル伝達の経路以外には、細胞表面の受容体及びMAPキナーゼに基づく伝達経路 (Madhani, H.D. et al., 1998, *Trends Genet.* 14: 151-155) や、細胞膜のリン脂質及びCキナーゼに基づく伝達経路 (Weinstein, I.B. et al., 1997, *Adv. Exp. Med. Biol.* 400A: 313-321) 等が知られているが、いずれの場合も蛋白質のリン酸化が経路の活性化のスイッチとして重要な機能を果たしていることが示されている。しかしながら、現在知られているシグナル伝達経路は、細胞内に存在することが予想される多くの伝達経路のごく一部であることが種々の研究から示唆されている。

このようにシグナル伝達経路を解明することは、生命活動の種々のメカニズムを解明する上で重要となることから、さらに新たな伝達経路の探索や既に知られている伝達経路に関与する物質の探索及びその物質の機能解析が進められている。中でも、シグナル伝達のスイッチ機構として重要な機能を果たすリン酸化反応の解析およびこの反応を担う酵素の探索等に関する研究が広く行われている。

このような蛋白質のリン酸化反応を担う酵素の探索は、主として既存の蛋白質リン酸化酵素をコードする遺伝子との相同性を比較することによりなされてきた。例えば、チロシン残基をリン酸化するリン酸化酵素のファミリーでは、これらファミリーに共通する配列 (Hunter T. et al., 1984, *Adv. Cyclic Nucleotide*

Protein Phosphorylation Res. 17: 443-455) が知られていることから、この共通配列に基いてプローブ等を設計しライブラリー等のスクリーニングを行うことによって、新たな酵素の探索が可能となる。このようにして新たに発見された酵素が蛋白質リン酸化活性を有するか否かは、主として $^{32}\text{P}$ 同位元素を用いたインビトロの解析系を用いて解析される (D. Grahame Hardie編、「蛋白質のリン酸化：実践的アプローチ (Protein Phosphorylation: A Practical Approach)」, 1993, Oxford University Press)。すなわち、探索した酵素、リン酸化領域を有する基質蛋白または既知のアミノ酸断片、および $^{32}\text{P}$ リン酸の三者を混合し、該基質蛋白又は該アミノ酸断片に $^{32}\text{P}$ が付加されるか否かを反応産物の放射能活性をモニターすることにより判定を行っている。

しかしながら、従来の蛋白質リン酸化の解析法においては $^{32}\text{P}$ のような放射性同位体を用いることが必要であるため、実験設備等の制約があり、また、実験操作自体も慎重を期す必要があることから操作が煩雑となっていた。また、このような実験は放射性同位元素の廃棄物を伴うので、自然環境的にも好ましいとは言えなかった。さらには、上記の解析法では細胞内の活性そのものを測定することはできず、人工的に作られた環境下での測定結果しか得られないという問題があった。

こうしたインビトロの解析系の問題を解消するために、インビボの測定系も開発されている。この方法は、直接リン酸化を測定するものではなく、リン酸化により誘導された細胞増殖を指標として蛋白質リン酸化反応を測定するものである。より具体的には、この解析系は細胞内への $^{3}\text{H}$ -チミジンの取り込み量から細胞増殖率を測定し、この細胞増殖率に基いてシグナル伝達経路の初期のリン酸化反応を測定しようとするものである。しかし、この方法においては、伝達経路の末端の活性、すなわち細胞増殖を指標として測定を行うため、リン酸化反応を迅速に測定することは困難である。また、リン酸化反応が生じるタイミング等を測定するには適した方法とはいえない。

一方、最近の報告では、生体内のカルシウム濃度を測定する解析系が報告されている (Miyawaki, A. et al., 1997, Nature 388: 882-887)。この系は、カルモジュリン蛋白質の両端に発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) の緑色蛍光蛋白質 (GFP) を融合させた融合蛋白質を用いて測定するものであり、この両端の GFP 蛋白質が互いに接近し相互作用すると蛍光を発するという性質を利用したものである。すなわち、一定量のカルシウムが中央のカルモジュリン蛋白質に結合するとカルモジュリン蛋白質の立体構造が変化して、その両端の GFP 蛋白質が相互作用により蛍光を発する。ここで発する光を測定することにより生体内のカルシウムの濃度を測定するという仕組みである。このようにカルシウム濃度の測定については、放射性同位体を使用せず、かつ、インビボの測定にも適用可能な優れた系が開発されているが、上述した蛋白質リン酸化反応についてはこのような系の開発が遅れている。

#### 発明の開示

本発明は、放射性同位体を使用せず、かつ、インビボの測定にも適用可能な蛋白質リン酸化の解析系を樹立することを課題とする。

本発明者らはまず、リン酸化を受けることがすでに知られているアミノ酸配列の代表例として、CREBリン酸化配列 (Gonzalez, G.A. et al., 1989, Cell 59: 675-680) およびケンブタイトリン酸化配列 (Kemp B.E. et al., 1977, J. Biol. Chem. 252: 4888-4894) をそれぞれコードする遺伝子を取得し、それぞれの遺伝子をプラスミド pETIC (Romoser V.A. et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 13270-13274) の RSGFP 部位 (RGFP と呼ばれる) と BSGFP 部位 (BGFP と呼ばれる) の間に挿入することによりプラスミド「pETIC-ART」および「pETIC-kempart」をそれぞれ作製した。両プラスミドともに「RSGFP-蛋白質リン酸化配列-BSGFP」なる構成を有する融合蛋白質を発現するプラスミドであり、蛋白質リン酸化配列のみが異なっている。また、リン酸化反応試験における陰性対照として、pETIC-1

を用いた。本プラスミドは、「RSGFP-カルモジュリン結合部位-BSGFP」なる構成を有する融合蛋白質を発現するプラスミド(Komoser V.A. et al., J. Biol. Chem., 1997, 272:13270-13274)である。

大腸菌BL-21(DE3)をpETIC-ART、pETIC-kempart、またはpETIC-1を用いて形質転換し、培養後細胞内の菌体より上記融合蛋白質を抽出した。

$^{32}\text{P}$ 同位元素を用いたインビトロの解析系を用いて解析したところ、pETIC-ARTおよびpETIC-kempartに由来する融合蛋白質はリン酸化を受けたが、pETIC-1に由来する融合蛋白質はリン酸化を受けなかった。

一方、 $^{32}\text{P}$ 同位元素を用いずに非放射性のリン酸を基質として反応を行った場合に蛍光変化が生じるかどうかを検討した。その結果、pETIC-ARTに由来する融合蛋白質はリン酸化反応の有無によって吸収波長の変化が観察されたが、pETIC-kempartまたはpETIC-1に由来する融合蛋白質は、リン酸化反応の有無によって吸収波長の変化が観察されなかった。この結果より、次の2つのことが明らかとなった。

1. 「pETIC-ART」に由来する融合蛋白質は、リン酸化を受けることにより、GFPの蛍光変化を惹起するために必要な蛋白質立体構造変化を生じる。
2. 「pETIC-kempart」に由来する融合蛋白質は、リン酸化を受けるが、それによって、GFPの蛍光変化を惹起するために必要な蛋白質立体構造変化を生じることはない。

すなわち、本発明者らは蛋白質のリン酸化が蛋白質の立体構造変化を惹起する場合があることを示した。上記に示した二種のGFP蛋白質の組み合わせは、立体構造変化を特性変化として捕らえるための一例であり、他の特性を有する蛋白質等でも同様の系の構築が可能であることは自明である。

したがって、特性変化を捕らえる領域、すなわち特性可変領域と、リン酸化を受ける領域、すなわちリン酸化領域とか融合した蛋白質を、蛋白質のリン酸化をモニターする蛋白質（モニター蛋白質）として使用することが可能となった。こ

の場合、放射性同位体を使用する必要はなく、かつ、インヒボの測定にも適用可能である。実際、本発明者らは、モニター蛋白質を発現するベクターを導入した細胞において、細胞が生きたままりアルタイムにリン酸化をモニターすることに成功した。

このようなモニター蛋白質は、蛋白質のリン酸化反応を容易にモニターできることより、新しいリン酸化酵素等のスクリーニング方法として利用することができる。また、この系を利用して、リン酸化を促進または抑制する化合物をスクリーニングすることも可能である。

なお、蛋白質リン酸化酵素には、立体構造変化を生じるものと生じないものと二種類あることが示されたことより、既存の<sup>32</sup>P同位元素を用いたインビトロの解析系とモニター蛋白質の特性変化を利用した方法とを併用することにより、蛋白質のリン酸化が立体構造変化を惹起するかどうかを判定することも可能となった。すなわち本発明は、

〔１〕リン酸化を受けるアミノ酸残基またはアミノ酸配列を含むリン酸化領域と、該アミノ酸残基または該アミノ酸配列がリン酸化を受けることにより生じる少なくとも該リン酸化領域を含む蛋白質の立体構造変化に起因した特性変化を示す特性可変領域とを含む、蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質、

〔２〕特性可変領域が蛍光を発する蛋白質であることを特徴とする、〔１〕に記載のモニター蛋白質、

〔３〕特性可変領域がリン酸化領域の両側に結合していることを特徴とする、〔１〕または〔２〕に記載のモニター蛋白質、

〔４〕特性可変領域が、発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) の緑色蛍光タンパク (GFP) を構成するRSGFPとBSGFPとからなることを特徴とする、〔３〕に記載のモニター蛋白質、

〔５〕リン酸化領域が配列番号：１に記載のアミノ酸配列からなる、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載のモニター蛋白質、



- 〔6〕〔1〕～〔5〕のいずれかに記載のモニター蛋白質をコードする核酸、
- 〔7〕〔6〕に記載の核酸を担持する発現ベクター、
- 〔8〕〔1〕～〔5〕に記載のモニター蛋白質、〔6〕に記載の核酸、または〔7〕に記載の発現ベクターのいずれかをある特定の細胞に導入することにより、該細胞のリン酸化能を測定する方法、
- 〔9〕被験蛋白質と〔1〕～〔5〕のいずれかに記載のモニター蛋白質とを反応させ、該モニター蛋白質の特性変化を測定する工程を含む、被験蛋白質のリン酸化能を測定する方法、
- 〔10〕リン酸化酵素をスクリーニングする方法であって、
- （a）被験蛋白質と〔1〕～〔5〕のいずれかに記載のモニター蛋白質とを反応させる工程、
- （b）該モニター蛋白質の特性変化を測定する工程、および
- （c）該モニター蛋白質の特性を変化させる被験蛋白質を選択する工程、を含む方法、
- 〔11〕リン酸化を促進または抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、
- （a）被験試料の存在下、リン酸化酵素および該リン酸化酵素によりリン酸化され得るリン酸化領域を含む〔1〕～〔5〕のいずれかに記載のモニター蛋白質とを接触させる工程、
- （b）該モニター蛋白質の特性変化を測定する工程、および
- （c）被験試料の非存在下における場合と比較して、該特性変化を促進または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法、
- 〔12〕リン酸化を促進または抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、
- （a）〔7〕に記載の発現ベクターが導入された細胞を調製する工程、
- （b）被験試料の存在下、該細胞で発現されたモニター蛋白質の特性変化を測定

する工程、および

(c) 被験試料の非存在下における場合と比較して、該特性変化を促進または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法、に関する。

以下本発明を具体的に説明する。

### 1. 蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質

リン酸化を測定するためのモニター蛋白質（以下、モニター蛋白質）は、「リン酸化領域」と1または複数の「特性可変領域」とを含む蛋白質である。

ここで「リン酸化領域」は、リン酸化を受けるアミノ酸残基を含み該アミノ酸残基がリン酸化を受けることにより立体構造が変化するものをいい、以下に示すリン酸化を受けることが知られている蛋白のうち、リン酸化により立体構造変化を示しうるものを用いることができる。リン酸化を受ける蛋白質としては、CREB転写因子 (Hagiwara, M. et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 13:4852-4859)、ATF1 (Shimomura, A et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 17957-17960) 等が挙げられる。

例えば、通常ではリン酸化によって立体構造の変化を起こさない蛋白質でも、モニター蛋白質にリン酸基特異的抗体を含めることによって、立体構造の変化を誘起することができると考えられる。よって、リン酸基特異的抗体と他の特性可変領域を組み合わせることも可能である。

また、リン酸化領域は蛋白質の全長を用いてもよいが、リン酸化を受けるアミノ酸残基を含む一部配列でも好適に使用することができる。例えば、CREB転写因子の場合には、133残基目のセリンがプロテインキナーゼAによるリン酸化の基質となることが知られており、この133残基目のセリンを含みリン酸化を受ける配列であればその一部配列であってもよく、例えば、この一部配列としては配列番号：1に記載されたアミノ酸配列を選択することができる。また、この「リン酸化を受けるアミノ酸残基」としては、セリンの他にチロシン、スレオニン等が挙げら

れる。

「特性可変領域」は、蛋白質がリン酸化を受けたことが容易に判定できるものであれば、いかなるアミノ酸配列であっても構わない。GFP等を例示することができる。

「特性可変領域」は、リン酸化領域と融合蛋白質を形成していれば分散して存在していても構わない。リン酸化領域を挟んで設けられた「測定蛋白対」としてモニター蛋白質を構成することも好適である。すなわち、リン酸化領域内のアミノ酸残基はリン酸化を受けることによりリン酸化領域の立体構造が変化して、両側に設けられた測定蛋白対が相互作用して測定可能な特性を示すことを特徴とする。従って、例えば各構成を以下のように設定することも可能である。

前記リン酸化領域を挟んで設けられる「測定蛋白対」は、前記リン酸化領域の立体構造変化により互いに相互作用をして測定可能な特性を示すものであればいかなるものをも用いることができるが、例えば、発光オワンクラゲのBSGFP及びRSGFPのように相互作用して蛍光を発光するものなどを好適に使用することができる。

モニター蛋白質には、上記「リン酸化領域」及び「特性可変領域」以外に所望の機能領域を付加することもできる。例えば、核内でのリン酸化を測定するためにモニター蛋白質を核に運ばせる核移行シグナル (Goldfarb, D.S. et al., 1986, Nature 322: 641-644) やモニター蛋白質を細胞に導入する際の指標となるマーカー (Heim, R. et al., 1995, Nature 373: 663-664) 等である。

## 2. モニター蛋白質の生成

上記モニター蛋白質の生成方法は特に限定はないが、例えば、モニター蛋白質をコードする核酸を大腸菌等の任意の宿主細胞内で発現させることにより生成することができる。すなわち、この「モニター蛋白質をコードする核酸」は、前記特性可変領域をコードする塩基配列とリン酸化領域をコードする塩基配列とを読み枠が一致するように接続し、これら測定蛋白対とリン酸化領域とが融合蛋白質

として発現し得るように構築する。ここで構築されたモニター蛋白質をコードする核酸を任意のベクターに接続し、適当な宿主細胞内に導入、発現させることにより増幅生成させることができる。ここで生成されたモニター蛋白質は、直接、好ましくは単離精製した後、インビトロ又はインビボのリン酸化の測定に用いることができる。

尚、モニター蛋白質の生成に使用する際のベクター及び宿主細胞の組合わせには特に限定はないが、モニター蛋白質の発現を高めるためには発現活性の高いプロモータの下流に接続させることもできる。こうしたプロモータ等は、既知のプロモータから任意に選定し使用することができる。

### 3. モニター蛋白質をコードする核酸

上記「モニター蛋白質をコードする核酸」は、モニター蛋白質をコードしていれば、その他の配列を有するものも含まれる。その他の配列としては、モニター蛋白質を細胞内で効率的に発現させる配列、例えば、プロモータ エンハンサのような制御配列等、または細胞内に該核酸が導入されたことを検出するための薬剤耐性マーカー等の選択遺伝子等が含まれる。

この核酸は、上述したモニター蛋白質を生成する目的で使用するだけでなく、細胞内に導入し直接モニター蛋白質を発現させて細胞内のリン酸化反応を直接検出する目的にも用いることができる。一般に蛋白に比べ核酸の形態のほうが、細胞内への導入効率は高いことから、核酸として細胞内に上記モニター蛋白質をコードする核酸を用いることにより、前記モニター蛋白質の細胞内への運搬効率を高めることができる。また、後述する通り、前記核酸をベクターに担持させることにより細胞内への運搬、核酸の調製を容易にすることができる。

### 4. モニター蛋白質をコードする核酸を担持するベクター

ベクターは、特に限定はなく、自己複製可能であり、転写開始配列を含むものであれば大腸菌、酵母、植物細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞などにおいて発現可能な公知のプラスミドを用いることができる。従って、これら公知のプラスミド

の中から試験対照とする細胞等に対応して適宜選択して使用することができる。

#### 5. リン酸化酵素をスクリーニングするためのモニター蛋白質

モニター蛋白質は、該モニター蛋白質のリン酸化領域をリン酸化する酵素の検索やスクリーニングに用いることもできる。所望のリン酸化領域を有するモニター蛋白質を、インビボまたはインビトロで被験蛋白質に作用させ、モニター蛋白質のリン酸化を検出することによって、該リン酸化領域をリン酸化する酵素をスクリーニングすることができる。インビボでスクリーニングを行う場合は、モニター蛋白質をコードする核酸を担持するベクターを用いることができる。被験蛋白質としては特に制限はない。天然の蛋白質ライブラリー、人工蛋白質ライブラリー、またはそれらのcDNAライブラリーなどを使用することかできる。また、リボザイムライブラリー等も使用できる。

#### 6. リン酸化を促進または抑制する化合物をスクリーニングするためのモニター蛋白質

モニター蛋白質は、該モニター蛋白質のリン酸化領域をリン酸化または脱リン酸化する酵素の活性の促進剤や阻害剤のスクリーニングに用いることもできる。例えば、被験試料の存在下、所望のリン酸化酵素を、該酵素によりリン酸化され得るリン酸化領域を有するモニター蛋白質に接触させ、モニター蛋白質の特性変化を検出する。被験試料としては特に制限はない。例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、修飾ペプチド、天然化合物などが挙げられる。被験試料非存在下と比較して、該特性変化を促進または抑制する化合物を選択する。モニター蛋白質の特性変化を促進する化合物は、リン酸化酵素活性を促進する化合物であると判定され、該特性変化を抑制する化合物は、リン酸化酵素活性を抑制する化合物であると判定される。これにより、該リン酸化酵素のリン酸化活性を促進または抑制する化合物を単離することが可能である。スクリーニングに用いるリン酸化酵素とリン酸化領域の組み合わせとしては、特に限定されない。

本発明のスクリーニングに用いられるリン酸化酵素（およびそのリン酸化配列）の例としては、例えば、Aキナーゼ（配列番号：1に記載のCREBリン酸化配列）、Gキナーゼ（RKRS\*RAE；ヒストン）、AMP活性化プロテインキナーゼ（HMRSAMS\*GLHLVKRR；アセチルCoAカルボキシラーゼ）、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII（PLRRTLS\*VAA；グリコーゲンシンターゼ）、平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼ（KKRAARATS\*NVFA；ミオシン軽鎖）、ホスホリラーゼキナーゼ（KRKQIS\*VRGSL；ホスホリラーゼ）、Cキナーゼ（VRKRT\*LRRL；EGF受容体）、v-Abl（RRLIEDAEY\*AARG；RR60<sup>Src</sup>）、EGF受容体プロテインキナーゼ（RREELQDDY\*EDD；エリスロサイトパンドIII）などが挙げられるが、これらに限定されない（括弧内はリン酸化される基質アミノ酸配列と基質蛋白質を示す）（R.B. Pearsonら、「合成ペプチドを用いたプロテインキナーゼおよびホスファターゼの特異的研究法」、D.G. Hardie編、日高弘義監修、MEDSiバイオ実験法シリーズ「プロテインキナーゼとホスファターゼ」、pp.225-228、1995年、メディカル・サイエンス・インターナショナル）。また、これらのキナーゼは、上記以外のアミノ酸配列を持つ蛋白質もリン酸化することが知られており、これらの基質部位のアミノ酸配列を適宜選択して使用することが可能である。

インビボでスクリーニングを行う場合は、モニター蛋白質をコードする核酸を担持するベクターを用いることができる。この系においては、目的のリン酸化酵素の活性を直接促進または抑制する化合物（該リン酸化酵素のアゴニストやアンタゴニスト）以外にも、該リン酸化酵素の発現や活性化に至るシグナル伝達を促進または抑制する化合物や、モニター蛋白質の脱リン酸化を促進または抑制する化合物などをスクリーニングすることもできる。化合物がリン酸化酵素に直接作用しているか否かは、精製したリン酸化酵素を用いたインビトロ系により確認することができる。インビボ系においては、例えば実施例に記載のようにGFPを特性可変領域に用いた場合、細胞を破碎することなくモニター蛋白質の特性変化を検出することが可能である。また、モニター蛋白質の特性変化を、生きた細胞にお

いてリアルタイムに検出することも可能である。これにより、被験化合物がリン酸化に及ぼす効果をより詳細に検証することかできる。

これらのスクリーニングにより、特定のキナーゼの特異的な阻害剤などを簡便にスクリーニングすることが可能となる。キナーゼは細胞の増殖や分化、免疫応答などにおけるシグナル伝達に重要な機能を有しており、単離される阻害剤などは、これらのシグナル伝達が関与する種々の疾患の予防薬や治療薬としての応用が期待される。

#### 図面の簡単な説明

図1は、pETICベクターの構造図である。

図2は、精製組換え蛋白質をSDS-PAGEで分離した後のCBB染色像を示す図である。

図3は、Aキナーゼによるリン酸化アッセイの結果を示す図である。

図4は、「ART」(Aキナーゼ反応性トレーサー; A-kinase Responsive Tracer) (pETIC-ART由来)の吸収波長のAキナーゼ添加による効果を示すグラフである。

図5は、「Kempart」(pETIC-Kempart由来)の吸収波長のAキナーゼ添加による効果を示すグラフである。

図6は、陰性対照蛋白質(pETIC-1由来)の吸収波長のAキナーゼ添加による効果を示すグラフである。

図7は、pCEP4の構造を示す図である。

図8は、COS-7生細胞内のART像を示す図である。(A)は、細胞全体で発現されたARTのBSGFP蛍光像である。(B)は、(A)と同じ領域の細胞のBSGFP/RSGFP 蛍光強度比の擬似カラー像である。細胞は0時間に5  $\mu$ Mのジブチリル-cAMP (db-cAMP) で処理を行った。バーは30  $\mu$ mを表す。

図9は、PKA阻害剤 H-89の存在下(白いバー)または非存在下(黒いバー)においてdb-cAMP処理した後のCOS-7細胞内のARTの蛍光強度比(平均 $\pm$ SEM, n=5)を

示す図である。0時間にcAMPアナログであるdb-cAMP（シブチリル-cAMP）を添加した。Rはさまざまな時間に約 $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ の正方形の領域内で検出された細胞像の蛍光強度比を表す。Rminは同じ細胞の最小蛍光強度比を表す。

### 発明を実施するための最良の形態

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

尚、この実施例では、リン酸化領域としてCREB転写因子のリン酸化配列（以下、CREBリン酸化配列という）を用い、また、測定蛋白対として発光オワンクラゲのRSGFPおよびBSGFPを用いてモニター蛋白質「ART」（Aキナーゼ反応性トレーサー；A-kinase Responsive Tracer）を構築し、リン酸化の検出を行った。なお、CREBリン酸化配列を配列番号：1に示した。

また、CREBリン酸化配列に代えてケンプタイド（kemptide）のリン酸化配列（配列番号：2）を用いたモニター蛋白質「Kempart」も同時に構築し、上記CREBリン酸化配列を保持するモニター蛋白質との比較を行った。

#### 【実施例1】 リン酸化配列をコートするDNA断片の合成

先ず、上記モニター蛋白質を構築するために、リン酸化配列をコードするDNA断片を合成した。CREBリン酸化配列をコードするDNA断片（以下CREB-DNA断片という）は、オリゴヌクレオチドLCR-1B（配列番号：3）を鋳型とし、また、プライマーとしてPCR-1K（配列番号：5）及びPCR-1A（配列番号：6）を用いてPCRにより増幅し合成した。

また、対照として用いるケンプタイドのリン酸化配列をコードするDNA断片（ケンプタイド-DNA断片という）は、オリゴヌクレオチドLKe-1B（配列番号：4）を鋳型とし、また、プライマーとしてPKe-1K（配列番号：7）及びPKe-1A（配列番号：8）のプライマーセットを用いて同様にPCRにより増幅し合成した。PCR反応の詳細な操作は次の通り行った。



PCR反応液をマイクロチューブ（0.2ml用）に調製した。PCR反応液の組成は、滅菌水（18.3 $\mu$ l）、10 $\times$ EXTaqバッファ（2.5 $\mu$ l）、dNTP混合液（2.0 $\mu$ l）、EXTaqポリメラーゼ（0.2 $\mu$ l）（宝酒造）、鋳型オリゴヌクレオチド（20 nmol/ml）（1.0 $\mu$ l）、プライマー（約50nmol/ml）（各0.5 $\mu$ l）とした。

上記各反応液を含むマイクロチューブをDNA増幅器（GeneAmp PCR System 2400、パーキネルマーゴージャパン株式会社）にセットしてPCR反応を実行した。PCR反応は、次の条件で行った。PCR反応は、変性工程（94 $^{\circ}$ C、30秒）を1サイクル行った後、変性工程（94 $^{\circ}$ C、50秒）、アニーリング工程（57 $^{\circ}$ C、1分）及び伸長工程（72 $^{\circ}$ C、1分）の一連工程を40サイクル実行し、最終的に伸長工程（72 $^{\circ}$ C、7分）を行った後、4 $^{\circ}$ Cに冷却した。

PCR反応終了後、電気泳動により増幅断片の確認のため電気泳動を行った。電気泳動を行うために反応液の一部（10 $\mu$ l）を分取し、この反応液に電気泳動用バッファを混合した。この混合液を10%アガロースゲル上で分画し、分画後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド染色法により、目的の断片を確認した。

目的の断片を剃刀等で切り出し、それぞれマイクロチューブ（1.5ml用）に移し、GeneCleanIIIキット（BIO 101社）を用いて各断片を回収した。回収した各DNAはトリスEDTA緩衝液（TE）（100 $\mu$ l）に溶解し、精製した。精製は、次の操作により行った。先ず、溶解液にフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）を加えて攪拌した。静置後、上清を除去して、エタノール沈殿を行った。上清を除去し、沈さを滅菌水を用いて溶解した。

#### 【実施例2】 モニター蛋白質遺伝子を担持するプラスミドの構築

上記各DNA断片を図1に示すpET10ベクター（J.Biol.Chem., 272：13270-13274, 1997）に挿入した。このpET10ベクターは、既に測定蛋白対としてRSGFP遺伝子及びBSGFP遺伝子が担持されていることから、これをRSGFP遺伝子とBSGFP遺伝子との間に上記DNA断片を挿入することにより、「RSGFP遺伝子-リソ酸化配列-BSGFP遺伝子」が配列されたモニター蛋白質遺伝子が構築される。

先ず、pETICベクター及び上記2つのDNA断片を常法に従い制限酵素KpnI、AgeIにより切断した。切断後、10%アガロースゲルを用いて、各断片及び直鎖状としたベクターを電気泳動により分画した。分画後、それぞれ目的の断片を上記と同様にGenecleanIIIキットにより回収し、精製した。これら切断片は、それぞれTEバッファー(10 $\mu$ l)に溶解した。

次に、上記溶解液を用い、pETICベクターにCREB-DNA断片又はケンプタイト-DNA断片をライゲーションにより接続した。ライゲーションはDNA Ligaton Kit Ver. 2(宝酒造株式会社)を用いて行った。

CREB断片液(5 $\mu$ l)に直鎖状としたpETICベクター液(3 $\mu$ l)を混合し、これに上記キットのI液(8 $\mu$ l)を添加し、16°C、30分間反応させた。ケンプタイト断片液(5 $\mu$ l)も同様にpETICベクター液(3 $\mu$ l)及び上記キットのI液(8 $\mu$ l)を混合して、ライゲーション反応を実行した。また、これ以外にも挿入断片に代えてTEバッファーのみのライゲーションサンプルも調製した。

上記ライゲーション反応液から目的のプラスミドを回収するために、上記ライゲーション反応液(8 $\mu$ l)をJM109コンピテントセル(100 $\mu$ l)と混合し、形質転換を行った。形質転換は、常法に従って行った。形質転換後のJM109を、カナマイシンを含有する寒天培地にひろげ、37°Cで一晩培養した。培養後、生育したカナマイシン耐性コロニーをかきとり、細胞内のプラスミドを解析した。この解析により、pETICベクターに目的の断片が挿入されているプラスミドを保持する細胞を選択し、これら細胞からプラスミドを調製した。なお、ここで調製されたプラスミドのうち、CREB断片が挿入されているプラスミドを「pETIC-ART」とし、ケンプタイト断片が挿入されているプラスミドを「pETIC-kempart」とした。

#### 【実施例3】 モニター蛋白質の生成

上記「pETIC-ART」または「pETIC-kempart」を用いて、それぞれCREB由来又はケンプタイト由来のリン酸化配列を含むモニター蛋白質の生成を行った。なお、これらプラスミドのベクターであるpETICベクターは、pET30aベクター(Novagen

社)を基に作製されたものであり、このpET30aベクターの有する機能を保持している。すなわち、このpETICベクターは、インサート領域の上流にT7プロモーターが備えられ、BL21(DE3)のような、lacUV5プロモーターの下流にT7 RNAポリメラーゼ遺伝子を保持する大腸菌内でIPTGにより目的蛋白質を発現誘導することかできる。また、ここで発現した組換え蛋白質には、ヒスチジンの標識(His-tag)が付加されるためNiアカロースにより容易に回収することが可能となる。「pETIC-ART」、「pETIC-kempart」を用いたモニター蛋白質の生成は、上記原理に基いて次の通り行った。

上記「pETIC-ART」、「pETIC-kempart」をそれぞれ上記と同様の方法によりBL21(DE3)コンピテントセルへ形質転換した。形質転換後、カナマイシン含有寒天培地上に形成されたコロニーをかきとり、3mlのLB培地(カナマイシン50 $\mu$ g/ml)に植菌し、37°Cで一晩培養し、前培養液を調製した。この前培養液(2ml)を同様のLB培地500mlを含む2Lフラスコに移し、37°Cで吸光度(600nm)が0.6となるまで培養した。吸光度(600nm)が0.6となったところでIPTGを1mMとなるように添加し、23°Cでさらに一夜培養した。

培養液を遠心分離(5000rpm、10分間、4°C)を行い、細胞を回収した。回収した細胞をバッファー(50mMトリス塩酸(pH7.5)、150mM NaCl、2mMベンスアミジン、1mM PMSF)10 mlに懸濁した。懸濁液を氷上にて30秒パルスの条件で5回超音波破碎を行った。破碎液にNP-40、およびイミタゲールをそれぞれ最終濃度0.1%、および20 mMとなるように添加し、その後、破碎液を4°Cにて攪拌器を用いて攪拌した。攪拌後、4°Cにて遠心分離(10,000rpm、10分)を行い、上清を回収した。

回収した上清にNi-NTA-アカロース(キアケン社)を500 $\mu$ l添加して、4°Cにて攪拌器により60分間攪拌した。攪拌後、上記Ni-NTA-アカロースを2 mlのハイニチンクバッファー(50 mMトリス塩酸(pH7.5)、150 mM NaCl、2 mM ベンスアミジン、1 mM PMSF、0.1% NP-40、20 mM イミタゲール)により4回洗浄した。

洗浄後、1 ml溶出バッファー(50mMトリス塩酸(pH 7.5)、150mM NaCl、2mM

ベンズアミジン、1mM PMSF、0.1%NP-40、200mM イミダゾール）を加えて、4°Cにて攪拌器を用いて30分間攪拌した。攪拌後、遠心分離を行い、上清を回収した。この一連の溶出操作を2回繰り返した。ここで回収された溶出液に、最終濃度20%となるようにグリセロールを添加し、-80°C下で保存した。

上記の方法で回収した溶出液10 $\mu$ lを10%アクリルアミドゲルにて電気泳動を行いモニター蛋白質を確認した。泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルー（CBB）を用いて染色した結果を図2に示す。なお、図2において、pETIC-1（Romeser, V.A.ら, J.Biol.Chem., 272:13270-13274）はpETICベクターにCa<sup>2+</sup>カルモジュリン結合部位をコードする配列が組み込まれたものであり、組換え蛋白質（RSGFP-カルモジュリン結合部位-BSGFP）の調製において陽性対照として用いた。また、「IPTG-」は培養時にIPTGによる誘導を行わなかったもの、「IPTG+」は培養時にIPTGによる誘導を行なったものを示す。

図2に示す通り、IPTGによる発現誘導を行った場合に「pETIC-ART」および「pETIC-Kempart」においてそれぞれ単一のバンドとして示される蛋白質が検出された。これら蛋白質は、陽性対照であるpETIC-1より発現される蛋白とほぼ同等のサイズを有していることから、ここで発現されている蛋白質が目的のモニター蛋白質、すなわち、RSGFP-CREBリン酸化配列-BSGFP、およびRSGFP-ケンブタイドリン酸化配列-BSGFPが生成されていることが予想された。

#### 〔実施例4〕 $\gamma$ -<sup>32</sup>Pを用いたリン酸化の測定

本実施例では、インビトロ系において上記2つのモニター蛋白質のリン酸化配列がリン酸化を受けるかを確認した。この確認試験は、リン酸化酵素としてAキナーゼを、また、基質として [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATPを用いて、以下の操作により実施した。

反応液を調製するために、10 $\times$ キナーゼバッファ（250mM Hepes pH7.5、100 mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT）（5 $\mu$ l）、Aキナーゼ（1 $\mu$ l）、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP（0.5 $\mu$ l）、滅菌水（43 $\mu$ l）を加え混合した。この混合液に各モニター蛋白質を含有する溶出液（

0.5  $\mu$ l) をそれぞれ添加した。添加後、反応液を30℃にて90分保温することによりリン酸化反応を実行させた。

反応後、各モニター蛋白質がリン酸化されているか否かを電気泳動により確認した。電気泳動の前処理として、反応後の反応液 (50  $\mu$ l) に2×サンプルバッファ (50  $\mu$ l) を添加し3分間煮沸した。煮沸後の液 (20  $\mu$ l) を用い10%アクリルアミドゲルにより電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルをフィルムに感光させ、 $\gamma$ -<sup>32</sup>Pのシグナルを検出した (図3)。

図3に示す通り、「pETIC-ART」由来のモニター蛋白質、及び「pETIC-kempart」由来のモニター蛋白質において、いずれもシグナルが検出された。また、このシグナルが特異的であることは、リン酸化配列を保持していないpETIC-1由来蛋白質においてシグナルが検出されないことから明らかである。また、「pETIC-ART」及び「pETIC-kempart」において検出されたシグナルの位置は、図2に示すこれらプラスミドが発現するモニター蛋白質のサイズともそれぞれ一致していた。これらの結果より、実施例3において生成された2つのモニター蛋白質はリン酸化配列を保持し、この配列がリン酸化を受けることが確認された。

#### 〔実施例5〕 蛍光変化によるリン酸化の測定

上記2つのモニター蛋白質は、リン酸化配列の一方にRSGFPが、他方にBSGFPが接続されている。これら2つのモニター蛋白質におけるリン酸化配列がリン酸化を受けることにより両側のRSGFPとBSGFPとが相互干渉して蛍光変化が生じるかを検討した。

反応液として、10×キナーゼバッファ (20  $\mu$ l)、ATP (100mM) (2  $\mu$ l)、滅菌水 (168  $\mu$ l) を混合し、この混合液に上記モニター蛋白質 (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) (10  $\mu$ l) を添加した。さらに、この反応液にAキナーゼを、添加量を変えて0、1、2又は4  $\mu$ l 添加した。

調製された反応液を30℃にて30分間保温した。保温後の反応液を蛍光分光光度計 (日本分光株式会社) により波長域430～520nmの範囲における吸収する波長域

の変化を測定した。「ART」(pETIC-ART由来)、「Kempart」(pETIC-kempart由来)、および陰性対照であるpETIC-1由来の組換え蛋白質における蛍光変化の結果を、それぞれ図4、5、および6に示す。また、上記においてAキナーゼの添加量の相違は、グラフ線を異ならして表現した。

図4に示す通り、「ART」については、Aキナーゼの非添加の吸収パターンと添加した場合の吸収パターンとの間に差が観られた。Aキナーゼ非添加の場合には、500nmにおいてより強い吸収が観られるが、Aキナーゼの添加量を増加させるに従って、450nmにおける吸収が增強された。このことからCREBリン酸化配列は、リン酸化を受けることにより立体構造の変化が生じ、これによってその両側のRSGFPとBSGFPとの相互干渉が可能となり、蛍光が発光されていることが示された。

一方、「Kempart」(図5)については、上記実施例3における $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATPを用いたリン酸化測定ではリン酸化が確認されているにもかかわらず、蛍光変化に関しては陰性対照(図6)と同様に上述したような波長域の変化は観察されなかった。このことからケンブクイドのリン酸化配列はリン酸化されるが、その際に立体構造の変化を伴わないことが予想された。

以上の通り、上記「ART」は、上述した蛍光変化を指標として、リン酸化反応の検出等に利用することができることが明らかになった。この「ART」を発現するpETIC-ARTを細胞内に導入することによりインビボ系の構築も可能となる。また、上記「ART」は、単にリン酸化反応の検出のみならず、リン酸化酵素のスクリーニングや、リン酸化活性の促進剤や阻害剤のスクリーニングにも利用することができる。

一方、ここではCREBリン酸化配列とケンブクイドリン酸化配列とではリン酸化された際の構造変化の有無という点で相違することが示された。このことは、RSGFP及びBSGFPは、リン酸化された際のリン酸化配列の構造変化の解析に利用することができることを示している。すなわち、RSGFPとBSGFPとの間に任意のリン酸化配列を挿入し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATPを用いたリン酸化測定及び蛍光変化に基づくリン酸化

化測定の方を実施し、これら結果によりリン酸化を受けた際の構造変化を観察することかできることを示された。

#### 〔実施例6〕 インヒビトによるリン酸化の測定

##### 1) pCEP4-ARTの構造と構築

pET10-ARTプラスミドと哺乳動物発現ベクターpCEP4(Invitrogen社)プラスミドベクター(図7)を制限酵素HindIIIとXhoIにて切断後、10%アカロースゲルで電気泳動し、目的のバンドをGeneCleanIIIキットで回収した。回収したDNAは10 $\mu$ lのTEに溶解し、DNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造株式会社)の1液8 $\mu$ lとDNA溶液8 $\mu$ lを混ぜ、16°Cで30分間ライゲーション反応を行った。その8 $\mu$ lを100 $\mu$ lのJM109大腸菌コンピクタントセルと混ぜ、形質転換した。アンピシリンプレートにまいて37°C終夜培養した後コロニーをかきとり、LB培地(アンピシリン50 $\mu$ g/ml)3ml中で37°C終夜培養した。終夜培養液2mlを2リットルフラスコ中のLB培地(アンピシリン50 $\mu$ g/ml)500mlに加え、37°Cで終夜培養した。大腸菌を回収し、キアゲン社キアゲンチップにてプラスミドDNA(pCEP4-ART)を回収した。

##### 2) COS-7細胞へのプラスミドDNA導入

pCEP4-ARTプラスミドDNA 1 $\mu$ gとリポフェクタミン試薬(GIBCO BRL)4 $\mu$ lを各々100 $\mu$ lの無血清DMEM培地に入れた後、それらを混合し室温にて30-40分静置した。30-40分後、ガラス底培養ディッシュ(MatTek社)にDNA導入前日から継代培養しておいたCOS-7細胞の培地を無血清DMEM培地800 $\mu$ lと交換し、そこにプラスミドDNAとリポフェクタミン試薬の混合液を加えて3時間培養した。その後、培地を10%ウシ血清の入ったDMEM培地1mlと交換して2日間培養した。

##### 3) リン酸化のイメージング

pCEP4-ARTをトランスフェクトしたCOS-7細胞をガラス底培養ディッシュ(MatTek)のカハースリップ(直径14mm)に播いた。30°Cで48時間インキュベートした後、細胞を2回リッシャーバッファー(150mM NaCl、4mM KCl、2mM CaCl<sub>2</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>、5mM Hepes (pH7.4)、および5.6mM グルコース)でリッシャーした後、このバッ

ファー中で室温で暗所に維持した。蛍光強度は、励起光 380nm、検出は $440 \pm 20$ nmおよび $520 \pm 20$ nmのバンドパスフィルターで行い、100倍の油浸対物レンズ (OLYMPUS UV-fluor) と Quantix CCDカメラ (Roper Scientific)、IPLab Spectrum image processor (Scanalytics) を用いて測定した。380nmの励起光の露光時間は0.2秒とし、露光間隔は 20秒とした。まず  $440 \pm 20$ nmのフィルターを通った像を検出し、5秒後に $520 \pm 20$ nmのフィルターを通った像を検出した。cAMPアナログであるジブチリル-cAMP (dibutyl- $\gamma$ -cAMP; db-cAMP)による細胞の誘導は、500 $\mu$ lのリンカーバッファーを含む培養ディッシュに、10 $\mu$ M db-cAMPを含む500 $\mu$ lのリンカーバッファー添加して行った。

#### 4) 結果

「ART」の細胞内局在を観察したところ、「ART」はCOS-7細胞内で拡散して存在していた (図8A)。cAMP (cyclic-adenosine mono phosphate)のアナログであるdb-cAMPで細胞内cAMP濃度を上昇させてAキナーゼを活性化し、細胞の蛍光変化を冷却CCDカメラでリアルタイムで測定した (図8B)。0秒の時点でdb-cAMPを加えた。その細胞像の蛍光強度比をみると、db-cAMPを加えると時間に依存して誘導倍率 (hold induction) の値 (蛍光強度比) が上昇した。誘導倍率の上昇は細胞膜側から核へと起っており、これは細胞質cAMP上昇後活性型Aキナーゼが細胞質から核内へと移動する現象とよく一致している。時間ごとの誘導倍率の平均値を表すと、その値はdb-cAMP刺激後経時的に上昇していた。このことは、「ART」が生きた細胞においてもリン酸化モニター系として利用可能なことを示している。

COS-7細胞内で「ART」は実際にAキナーゼ依存的なリン酸化がなされているのかを調べるため、Aキナーゼの選択的インヒビターであるH-89によって、細胞内Aキナーゼを阻害し、図8と同様にdb-cAMP刺激する実験を行った。細胞を 10 $\mu$ M H-89を含むDMEMで約2時間前処理を行い、その後 10 $\mu$ MのH-89を含むリンカーバッファーに交換した以外は、上記と同様に実験を行った。このときの「ART」の細胞内での蛍光変化を冷却CCDカメラでリアルタイムで測定した (図9)。10 $\mu$ m $\times$ 10 $\mu$ m



の範囲の領域の蛍光強度比を比較すると、H-89 存在時は蛍光強度比が低かった。つまりAキナーゼの活性が抑制されていることが、生きた細胞においてリアルタイムで観察できることが示された。

以上に示したように、本発明のモニター蛋白質を用いて、インヒボでリン酸化をモニターする系が構築された。この系を用いれば、より生理条件に近い環境下で、簡便にリン酸化をモニターすることが可能である。また、この系を用いてリン酸化酵素の阻害剤の効果を簡便にモニターできることが示された。従ってこの系は、リン酸化を促進または抑制する化合物をスクリーニングするために有用である。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によって、放射性同位体を使用せず、かつ、インヒボの測定にも適用可能な蛋白質リン酸化の解析系が開発された。本発明の解析系は、単にリン酸化反応の検出のみならず、リン酸化酵素のスクリーニングや、リン酸を促進または抑制する化合物のスクリーニングにも利用することができる。

## 請求の範囲

1. リン酸化を受けるアミノ酸残基またはアミノ酸配列を含むリン酸化領域と、該アミノ酸残基または該アミノ酸配列がリン酸化を受けることにより生じる少なくとも該リン酸化領域を含む蛋白質の立体構造変化に起因した特性変化を示す特性可変領域とを含む、蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質。
2. 特性可変領域が蛍光を発する蛋白質であることを特徴とする、請求項 1 に記載のモニター蛋白質。
3. 特性可変領域がリン酸化領域の両側に結合していることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載のモニター蛋白質。
4. 特性可変領域が、発光オワンクラケ (*Aequorea victoria*) の緑色蛍光タンパク (GFP) を構成する RSGFP と BSGFP とからなることを特徴とする、請求項 3 に記載のモニター蛋白質。
5. リン酸化領域が配列番号: 1 に記載のアミノ酸配列からなる、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のモニター蛋白質。
6. 請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のモニター蛋白質をコードする核酸。
7. 請求項 6 に記載の核酸を担持する発現ベクター。
8. 請求項 1 ～ 5 に記載のモニター蛋白質、請求項 6 に記載の核酸、または請求項 7 に記載の発現ベクターのいずれかをある特定の細胞に導入することにより、該細胞のリン酸化能を測定する方法。
9. 被験蛋白質と請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のモニター蛋白質とを反応させ、該モニター蛋白質の特性変化を測定する工程を含む、被験蛋白質のリン酸化能を測定する方法。
10. リン酸化酵素をスクリーニングする方法であつて、
  - (a) 被験蛋白質と請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のモニター蛋白質とを反応させる工程、

(b) 該モニター蛋白質の特性変化を測定する工程、および

(c) 該モニター蛋白質の特性を変化させる被験蛋白質を選択する工程、を含む方法。

11. リン酸化を促進または抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被験試料の存在下、リン酸化酵素および該リン酸化酵素によりリン酸化され得るリン酸化領域を含む請求項1～5のいずれかに記載のモニター蛋白質とを接触させる工程、

(b) 該モニター蛋白質の特性変化を測定する工程、および

(c) 被験試料の非存在下における場合と比較して、該特性変化を促進または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法。

12. リン酸化を促進または抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項7に記載の発現ベクターが導入された細胞を調製する工程、

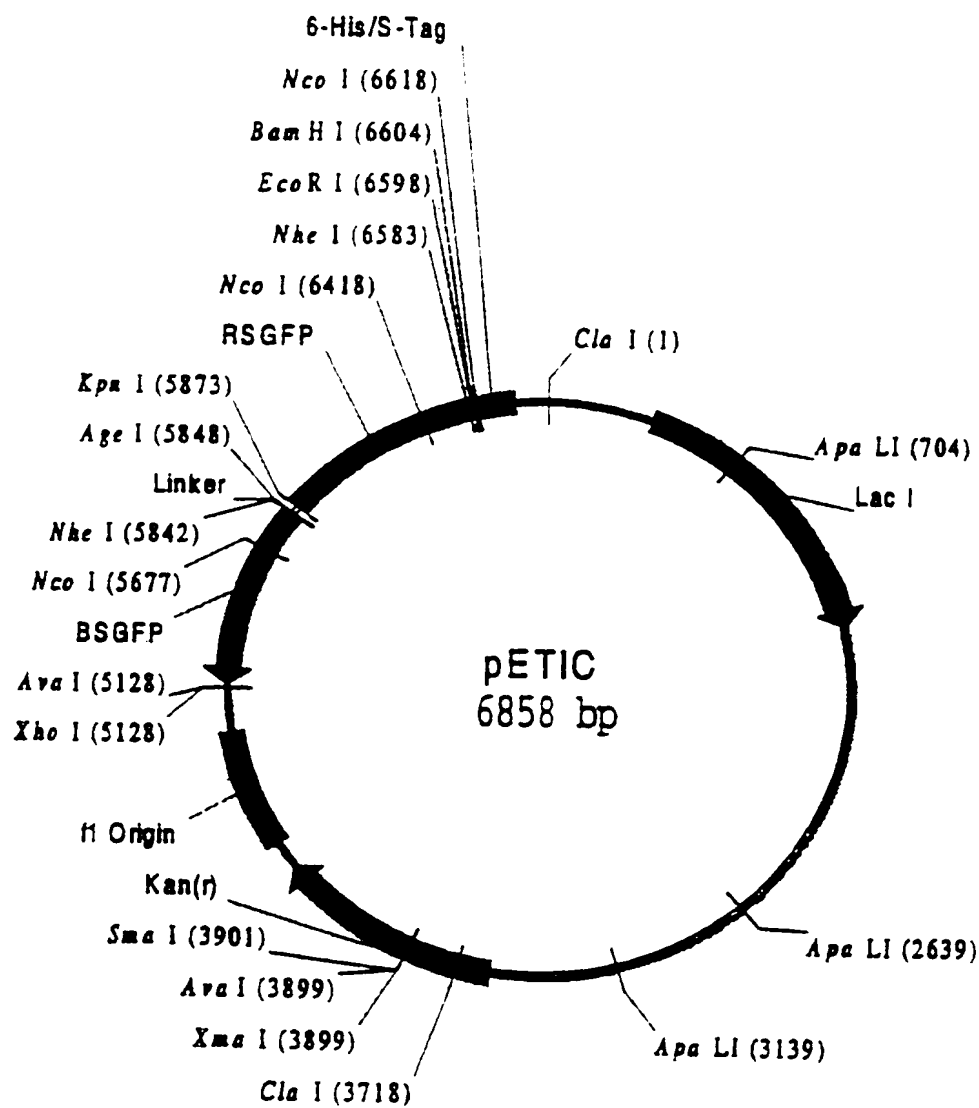
(b) 被験試料の存在下、該細胞で発現されたモニター蛋白質の特性変化を測定する工程、および

(c) 被験試料の非存在下における場合と比較して、該特性変化を促進または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法。



1 / 9

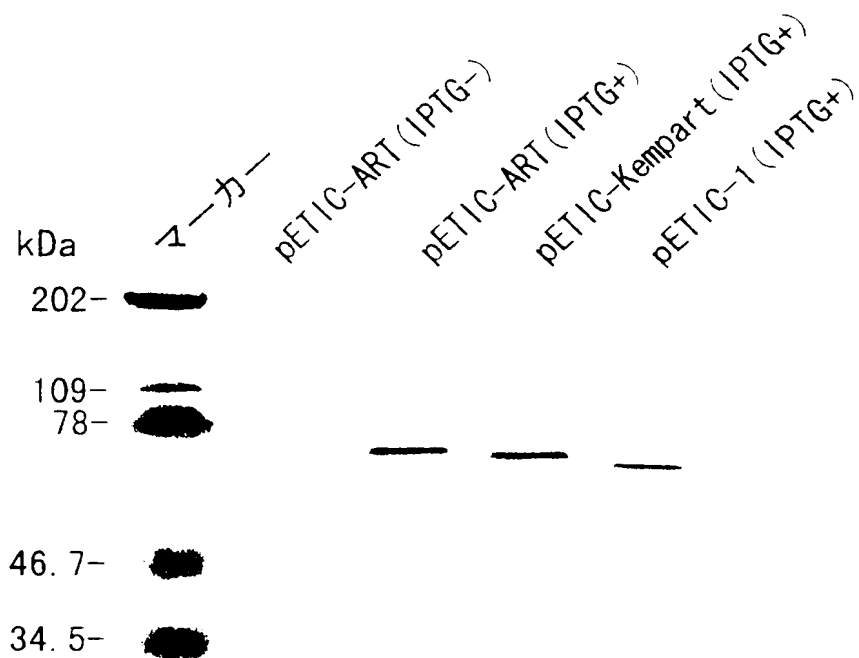
1

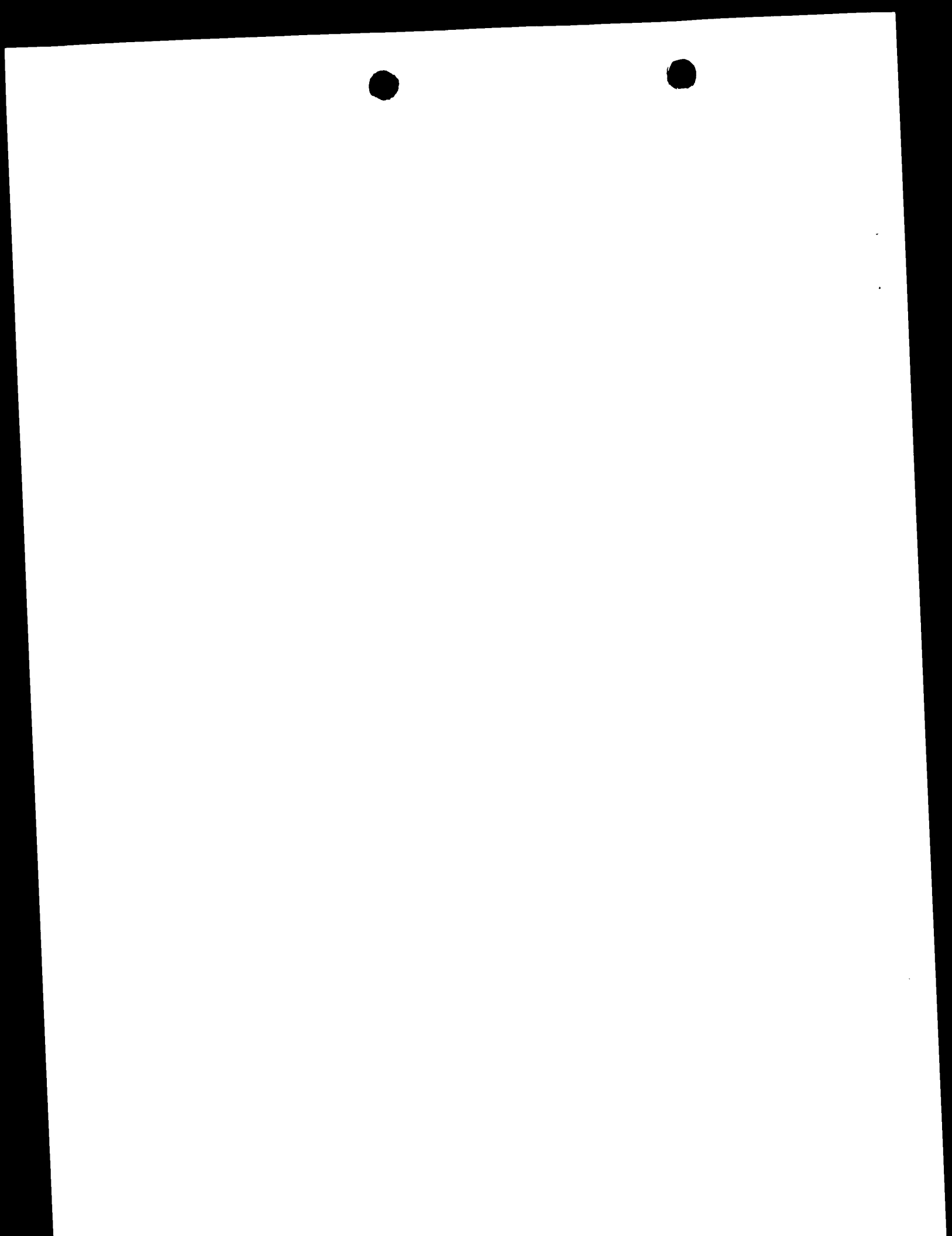




2 / 9

図 2







3 / 9

3

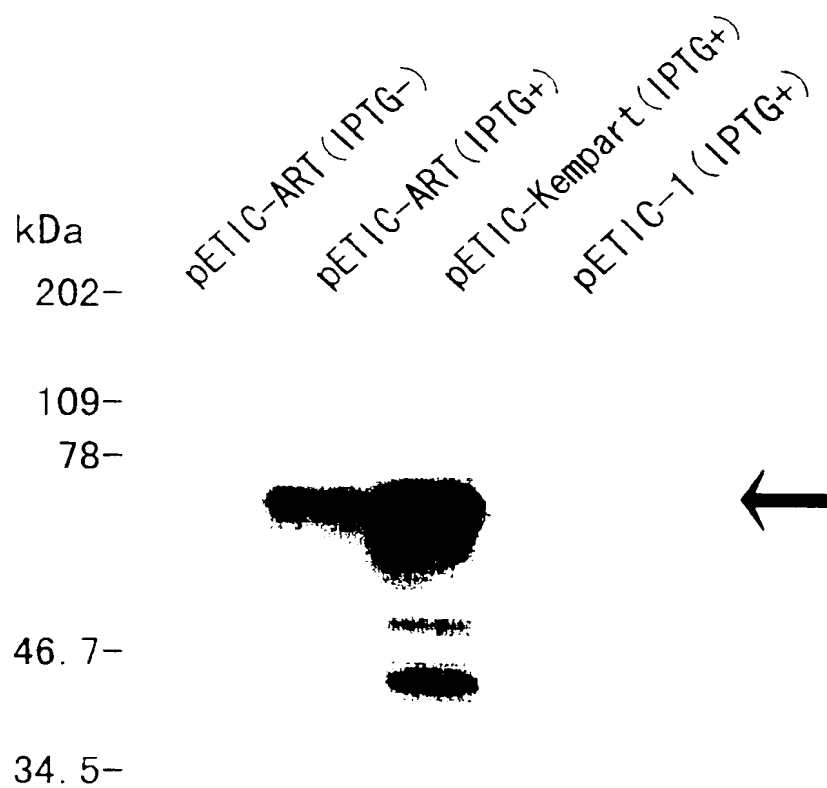
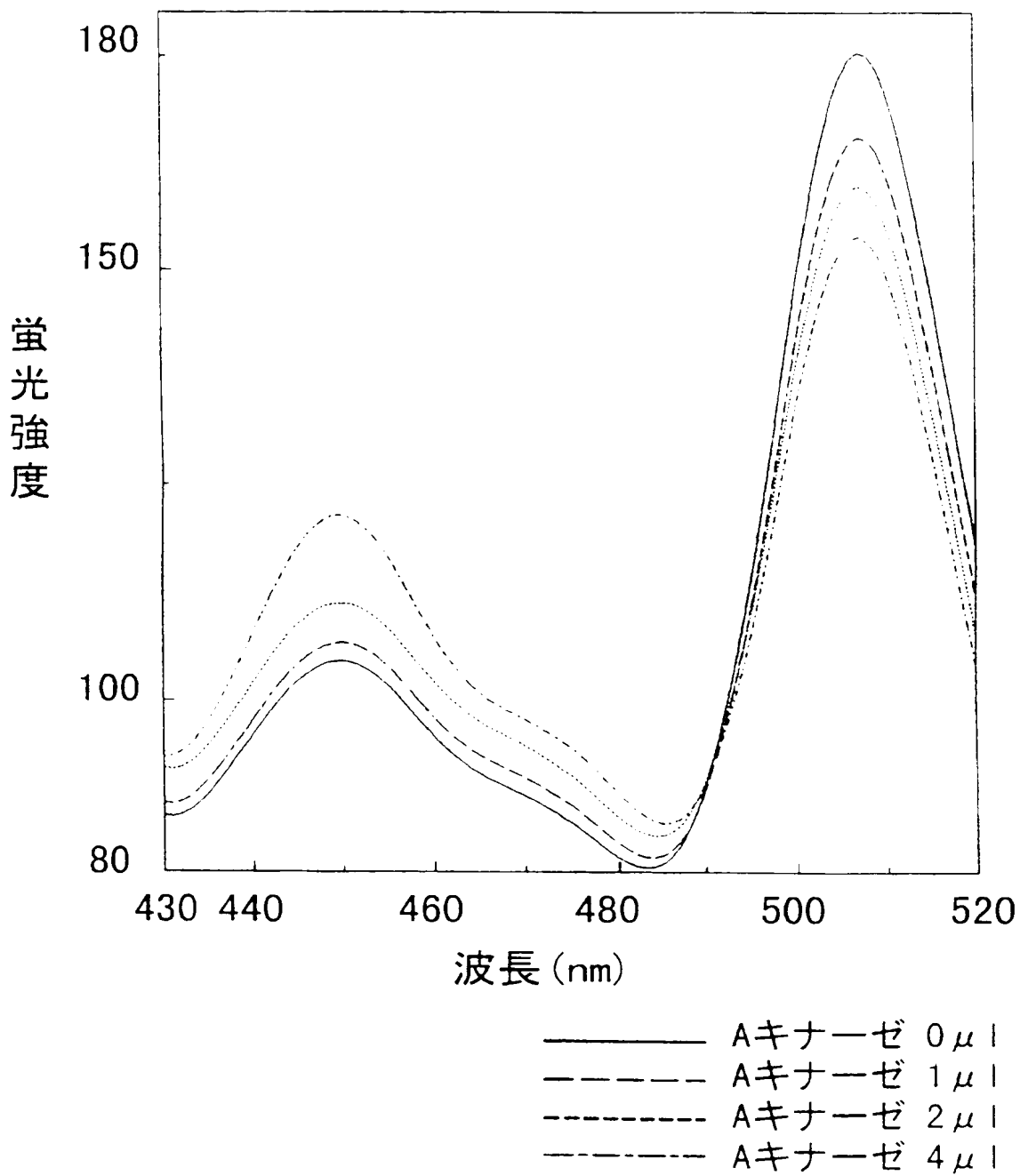




図 4





5 / 9

図 5

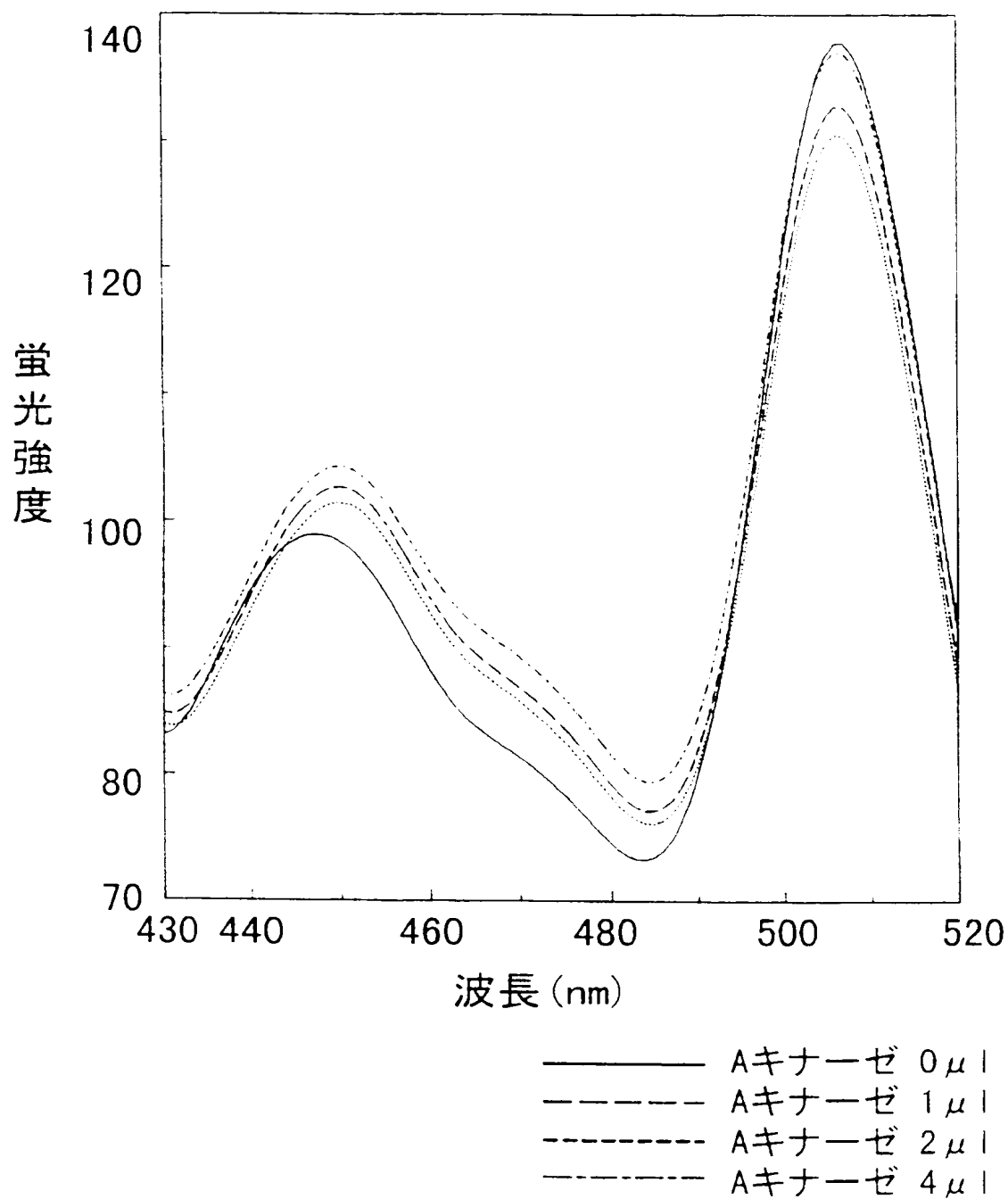




図 6

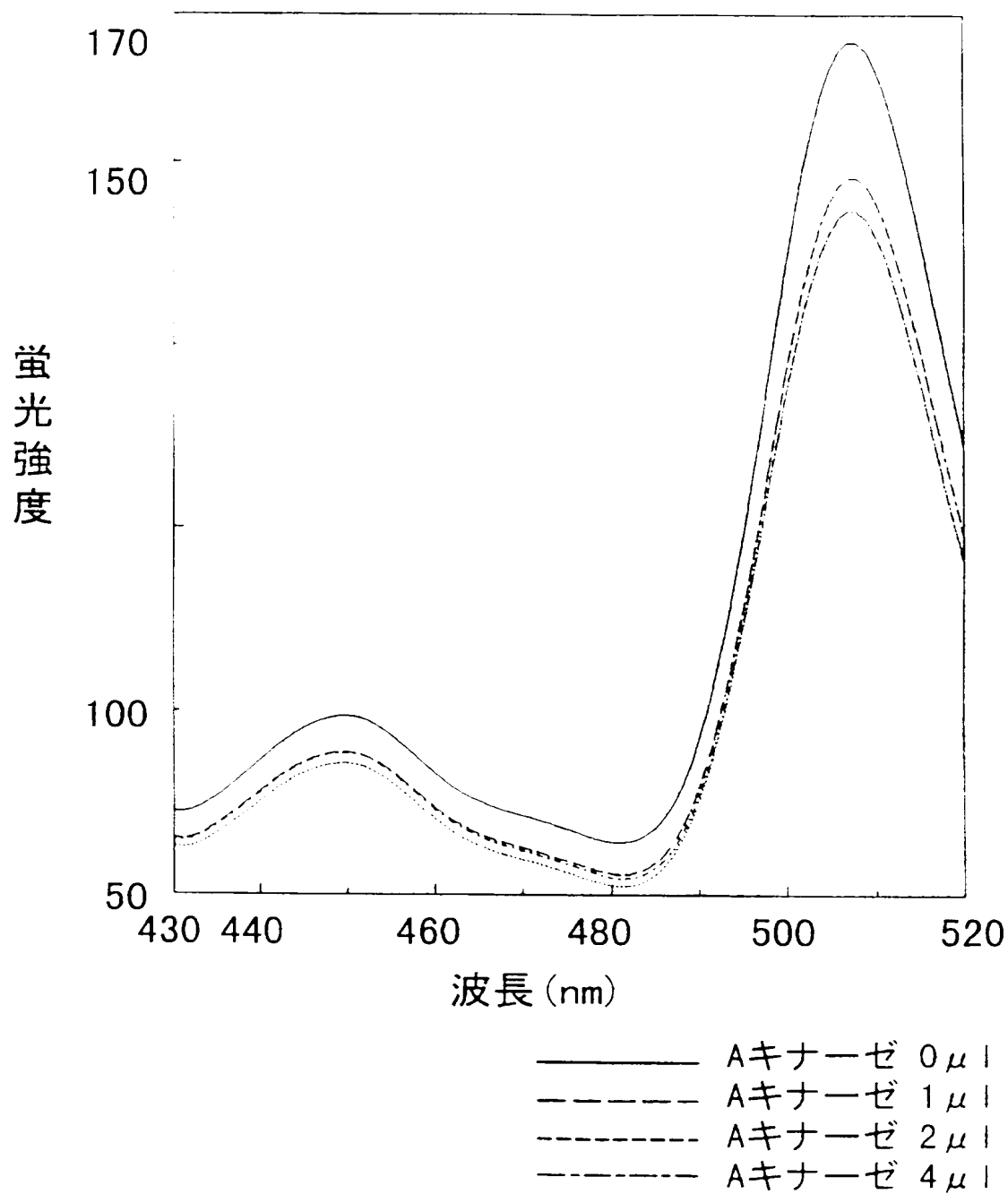
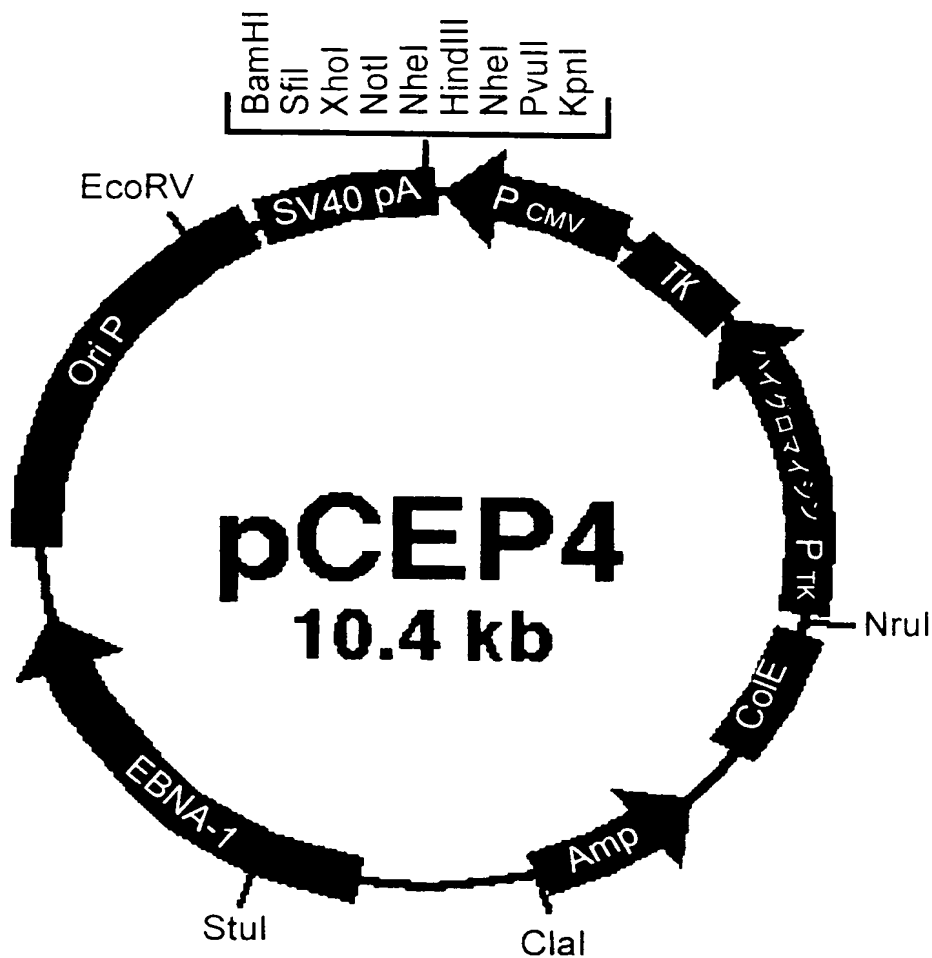






図 7



## pCEP4 (10380bp) の構成要素

SV40 Poly A シグナル: 塩基 7-405  
 Multiple Cloning Site: 塩基 406-463  
 CMV プロモーター: 塩基 467-1311  
 TK Poly A シグナル: 塩基 1473-1843  
 Hygromycin 遺伝子: 塩基 1844-2893  
 TK プロモーター: 塩基 2894-3136  
 Ampicillin resistance/pUC origin: 塩基 3635-5526  
 EBNA-1 遺伝子: 塩基 5533-8113  
 Ori P: 塩基 8142-10078



図 8

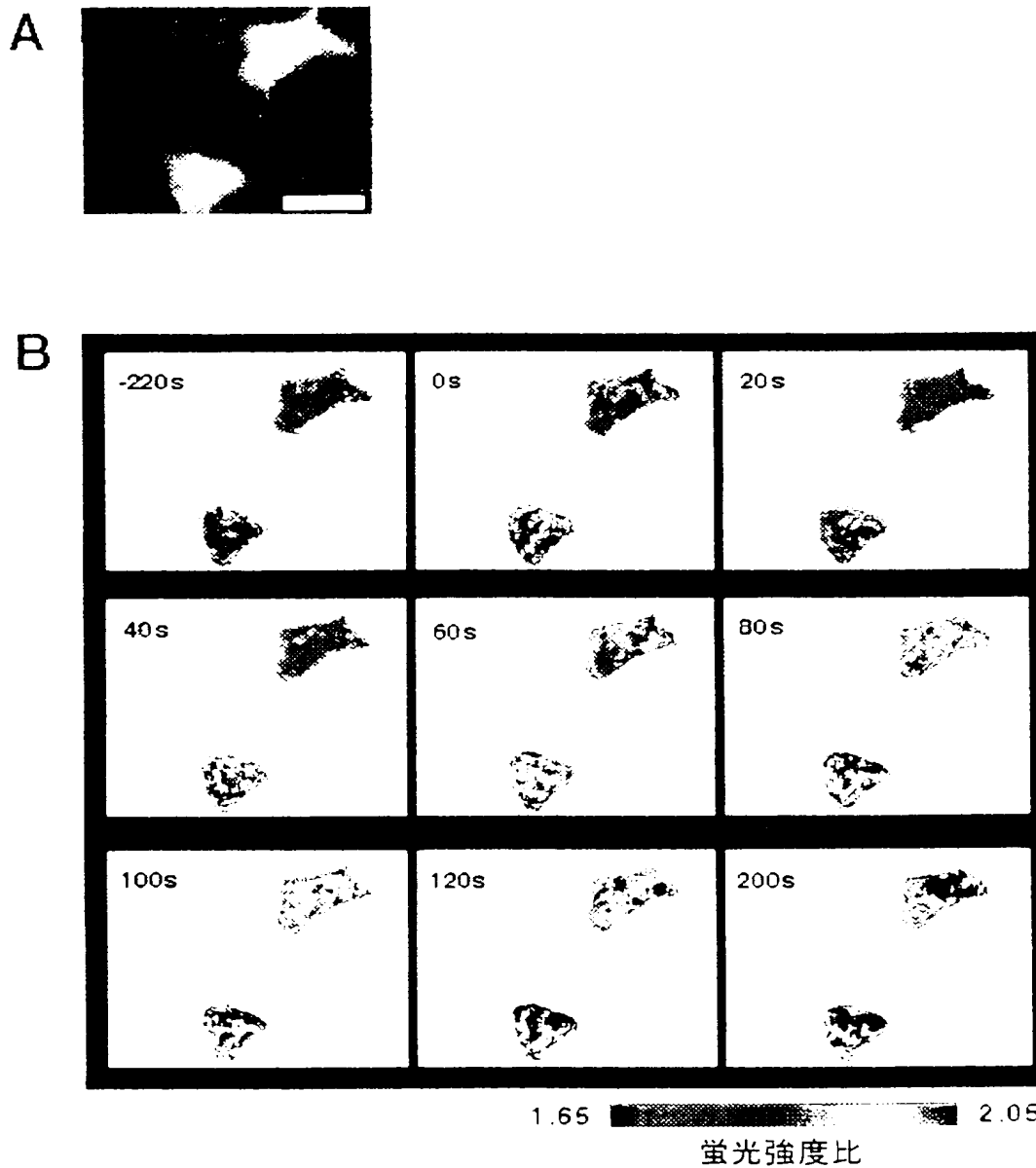
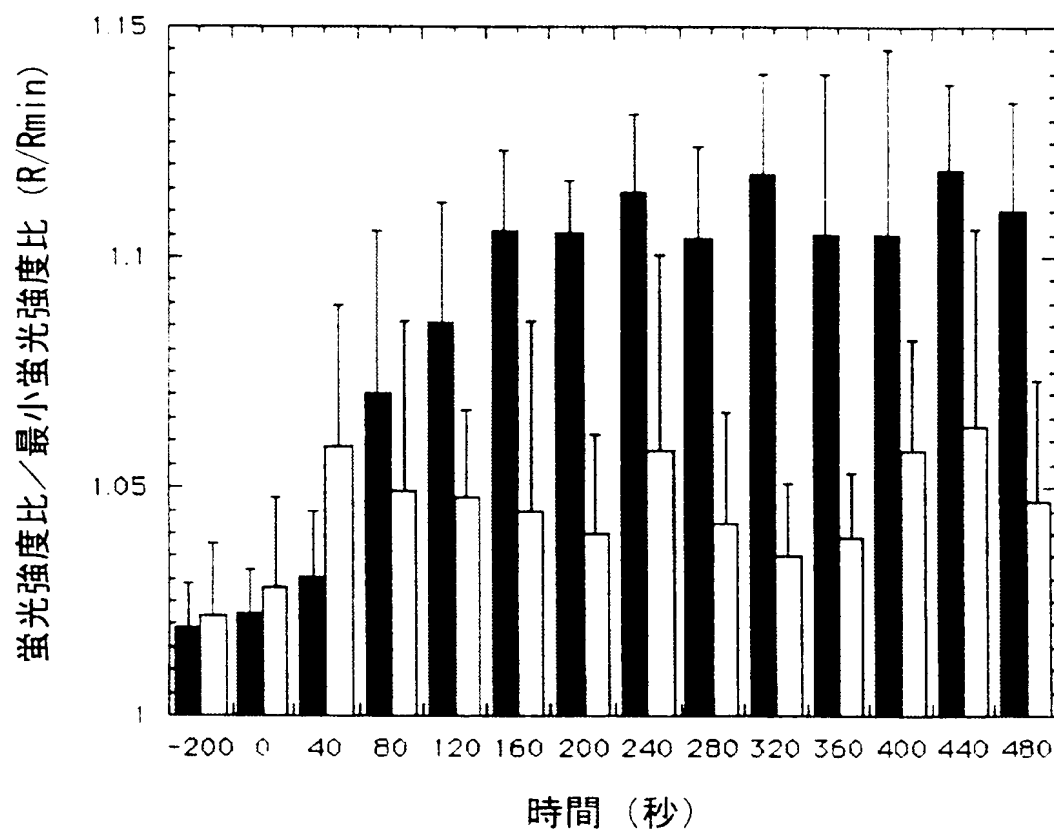
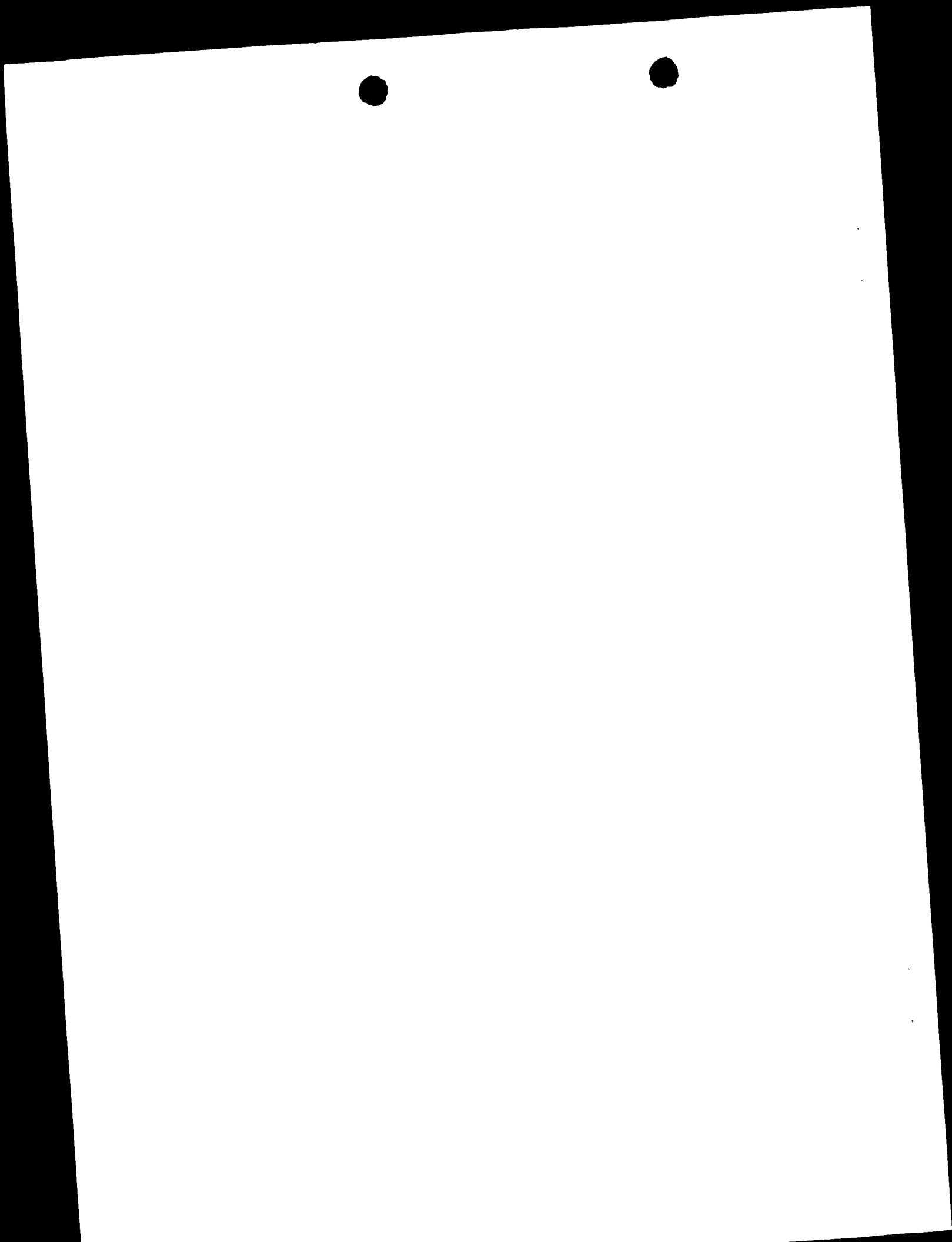




図 9





## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.

株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター

<120> Monitor proteins for measurement of protein phosphorylation

蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質

<130> SEN-001PCT

<150> JP 1998-248861

<151> 1998-09-02

<160> 8

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: CREB

phosphorylation region.





<400> 1

Thr Ser Ser Glu Ile Leu Ser Arg Arg Pro Ser Tyr Arg Lys Ile Leu

1

5

10

15

Asn Asp Leu Ser Ser Asp Thr

20

<210> 2

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Kemptide  
phosphorylation region.

<400> 2

Thr Ser Leu Arg Arg Ala Ser Leu Gly Thr Gly His Ala Val Arg Ala

1

5

10

15

Ile Gly Arg Leu Ser Ser Thr

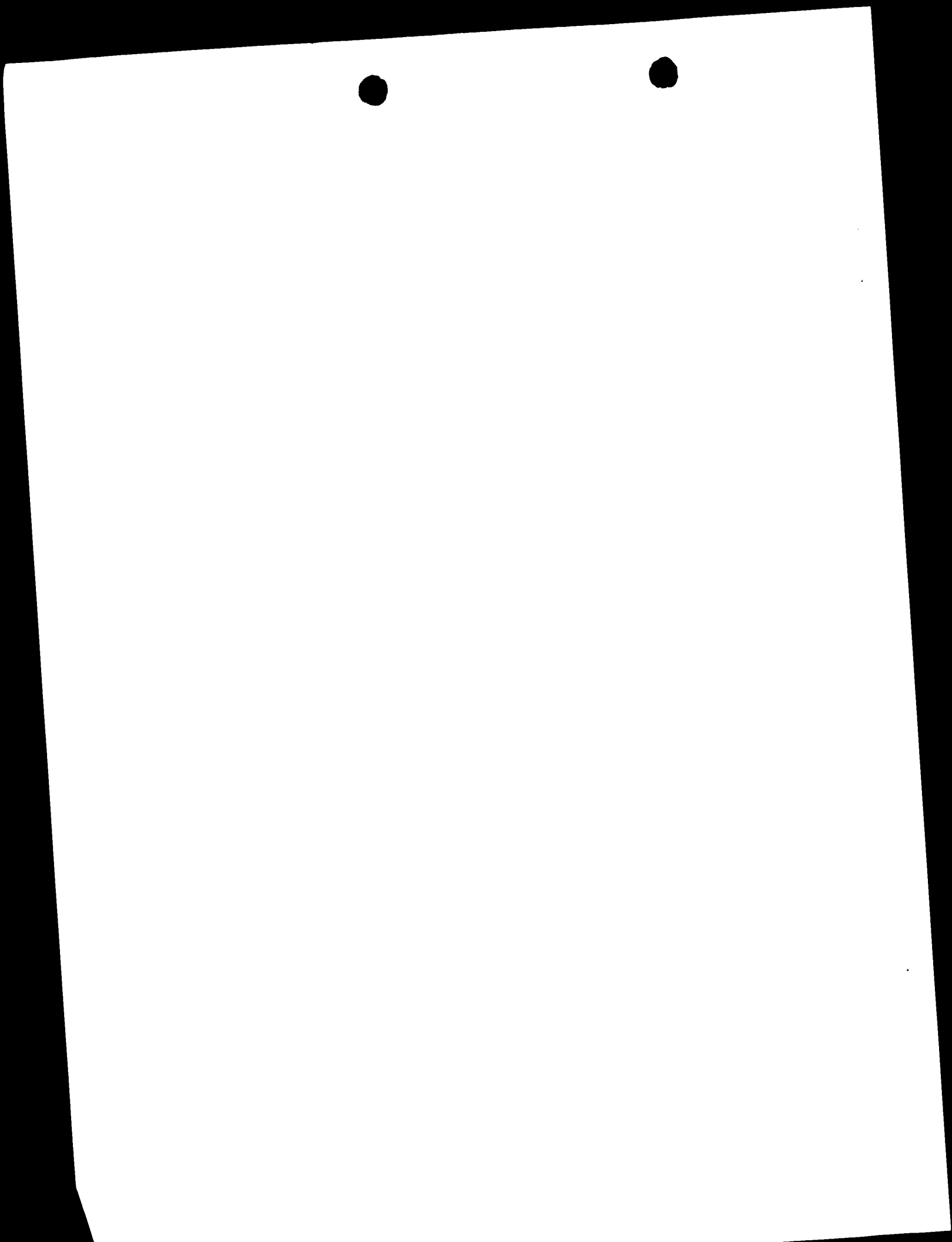
20

<210> 3

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 'LCR-1B',

a template for generation of CREB phosphorylation region.

<400> 3

cgggtatccg atgacagatc gttcaggatc ttgcgatatg atggacgtcg cgacaggatc 60  
tctgatgagg tac 73

<210> 4

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 'LKe-1B',

a template for generation of Kemptide  
phosphorylation region.

<400> 4

cgggtggacg acaatcgtec gatagcgcgt actgcgtgac cggttcctaa cgatgctega 60  
cgcaatgagg tac 73

<210> 5

<211> 23

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 'PCR-1K',

a PCR-primer for generation of CREB  
phosphorylation region.

<400> 5

tgctgtacc tcacagaga tcc

23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 'PCR-1A',

a PCR-primer for generation of CREB phosphorylation region.

<400> 6

agcacggta tccgatgaca gat

23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 'PKe-1K',  
a PCR-primer for generation of Kemptide  
phosphorylation region.

<400> 7

tgctggtacc tcattgcgtc gag

23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

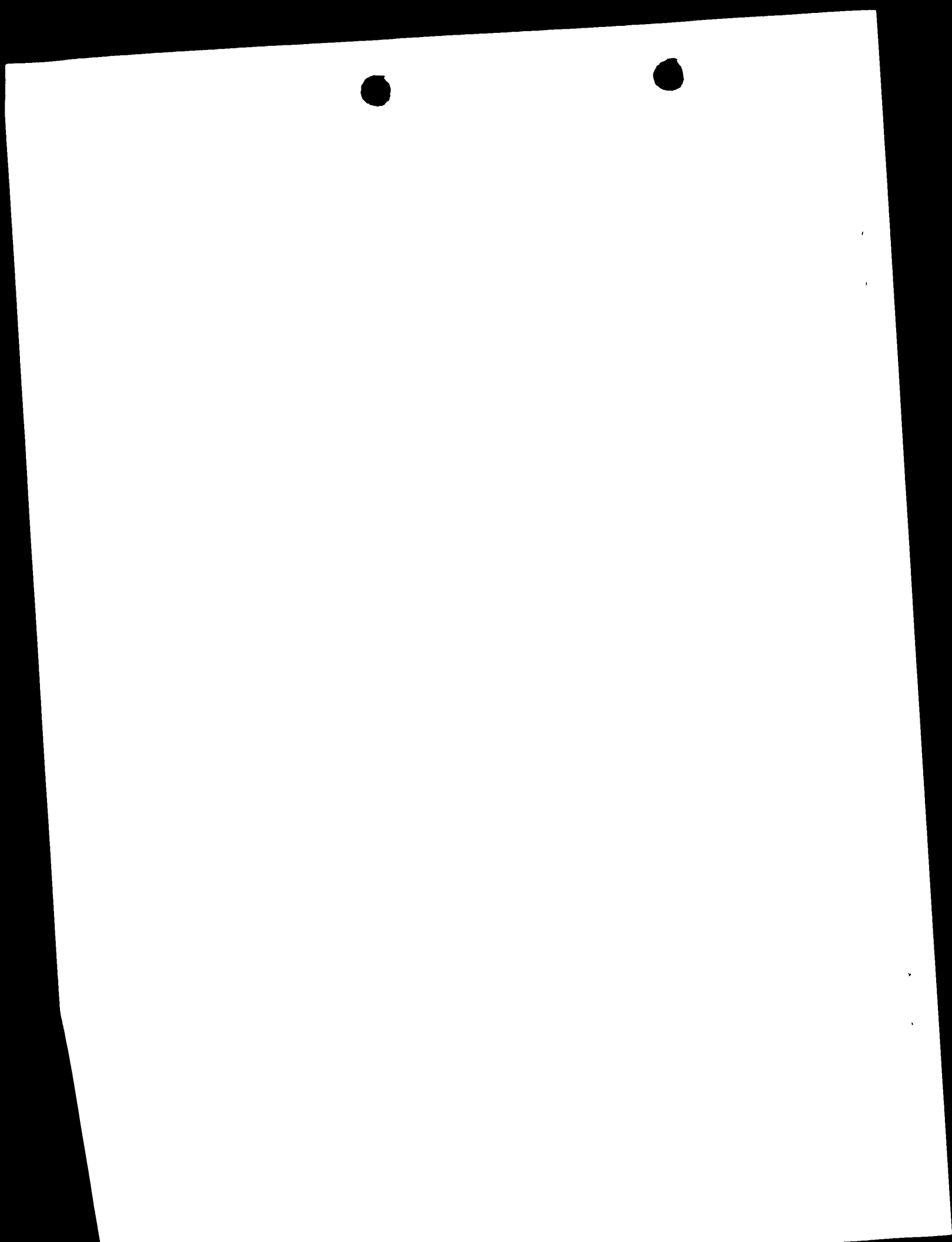
<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 'PKe-1A',  
a PCR-primer for generation of Kemptide  
phosphorylation region.

<400> 8

atcaccggtg gacgacaatc gtc

23





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04769

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C07K2/06, C12N15/10, C12Q1/02, G01N33/50, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. C07K2/06, C12N15/10, C12Q1/02, G01N33/50, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 272, NO. 20, (1997) Valerie A. Romoser et al. "Detection in Living Cells of Ca <sup>2+</sup> -dependent Changes in the Fluorescence Emission of an Indicator Composed of Two Green Fluorescent Protein Variants Linked by a Calmodulin-binding Sequence", see P.13270-13274	1-12
A	NATURE VOL. 388, (1997), Miyawaki et al. "Fluorescent indicators for Ca <sup>2+</sup> based on greenfluorescent protein and calmodulin" see P.882-887	1-12
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY Vol. 13, NO. 8, (1993), MASATOSI HAGIWARA et al. "Coupling of Hormonal Stimulation and Transcription via the Cyclic AMP-Responsive Factor CREB Is Rate Limited by Nuclear Entry of Protein Kinase A", see P.4852-4859	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.



Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing  
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 November, 1999 (30.11.99)

Date of mailing of the international search report

14 December, 1999 (14.12.99)

Name and mailing address of the ISA

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04769

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol.271, No.30, (1996), Atsushi Shimomura et al. "Calmodulin-dependent Protein Kinase . Potentiates Transcriptional Activation through Activating Transcription Factor 1 but Not camp Response Element-binding Protein", see P.17957-17960	1-12

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/04769

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.

C07K2/00, C12N15/10, C12Q1/02, G01N33/50, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.

C07K2/00, C12N15/10, C12Q1/02, G01N33/50, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の  
カテゴリー\*

引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示

関連する  
請求の範囲の番号

A

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol.272, NO.20, (1997)  
Valerie A. Romoser et al. "Detection in Living Cells of  
Ca<sup>2+</sup>-dependent Changes in the Fluorescence Emission of an  
Indicator Composed of Two Green Fluorescent Protein  
Variants Linked by a Calmodulin-binding Sequence",  
see P.13270-13274

1-12

A

NATURE VOL.388, (1997), Miyawaki et al. "Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent protein and calmodulin"  
see P.882-887

1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

A) 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

E) 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

I) 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

O) 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

P) 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

T) 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

X) 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

Y) 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

Z) 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.11.99

国際調査報告の発送日

14.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (JISA-JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美


1B 8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY Vol.13, NO.8, (1993), MASATOSI HAGIWARA et al. "Coupling of Hormonal Stimulation and Transcription via the Cyclic AMP-Responsive Factor CREB Is Rate Limited by Nuclear Entry of Protein Kinase A" see P.4852-4859	1-12
A	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol.271, No.30, (1996), Atsushi Shimomura et al. "Calmodulin-dependent Protein Kinase II Potentiates Transcriptional Activation through Activating Transcription Factor 1 but Not cAMP Response Element-binding Protein", see P.17957-17960	1-12

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人 清水 初志	
あて名	
〒 300-0847	
茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所	

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨  
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)  
〔PCT規則44.1〕

発送日  
(日.月.年)

99.12.99

出願人又は代理人 の書類記号	SEN-001PCT	今後の手続きについては、下記1及び4を参照。
国際出願番号	PCT/J P 99/04769	国際出願日 (日.月.年)
		02.09.99
出願人（氏名又は名称） 株式会社先端科学技術インキュベーションセンター		

- ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。  
PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出  
出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる（PCT規則46参照）。  
いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。  
詳細については添付用紙の備考を参照すること。  
どこへ 直接次の場所へ  
The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland  
Facsimile No.: (41-22)740.14.35  
詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。
- ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項（PCT17条(2)(a)）の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
- ☐ 法施行規則第44条（PCT規則40.2）に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。  
☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。  
☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。
- 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。  
優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。  
出願人が優先日から30月まで（官庁によってはもっと遅く）国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。  
国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名 日本国特許庁（ISA, JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 特 許 庁 長 官	4 B	8 9 3 1
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/ISA/220（1998年7月）

（添付用紙を参照）



P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
[P C T 1 8 条、P C T 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 S E N - 0 0 1 P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0 ) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 4 7 6 9	国際出願日 (日.月.年) 0 2 . 0 9 . 9 9	優先日 (日.月.年) 0 2 . 0 9 . 9 8
出願人 (氏名又は名称) 株式会社先端科学技術インキュベーションセンター		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 ( P C T 1 8 条 ) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 ( P C T 規則38.2(b) ) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。





## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup>

C 07 K 2 / 00, C 12 N 15 / 10, C 12 Q 1 / 02, G 01 N 33 / 50 // C 12 Q 1 / 68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup>

C 07 K 2 / 00, C 12 N 15 / 10, C 12 Q 1 / 02, G 01 N 33 / 50, C 12 Q 1 / 68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol.272, NO.20, (1997) Valerie A. Romoser et al. "Detection in Living Cells of Ca <sup>2+</sup> -dependent Changes in the Fluorescence Emission of an Indicator Composed of Two Green Fluorescent Protein Variants Linked by a Calmodulin-binding Sequence", see P. 13270-13274	1-12
A	NATURE VOL.388, (1997), Miyawaki et al. "Fluorescent indicators for Ca <sup>2+</sup> based on green fluorescent protein and calmodulin" see P. 882-887	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 11. 99

国際調査報告の発送日

12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

4 B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY Vol.13, NO.8, (1993), MASATOSI HAGIWARA et al. "Coupling of Hormonal Stimulation and Transcription via the Cyclic AMP-Responsive Factor CREB Is Rate Limited by Nuclear Entry of Protein Kinase A" see P.4852-4859	1 - 1 2
A	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol.271, No.30, (1996), Atsushi Shimomura et al. "Calmodulin-dependent Protein Kinase II Potentiates Transcriptional Activation through Activating Transcription Factor 1 but Not cAMP Response Element-binding Protein" , see P.17957-17960	1 - 1 2

